

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0312-04

红景天甙对体外培养的腺样囊性癌细胞的作用

李美华¹, 张桂珍², 王医术³

(1.吉林大学第三临床学院 口腔科; 2.中心研究室, 吉林 长春 130031;

3.吉林大学 病理生物学教育部重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的 体外研究红景天甙对唾液腺腺样囊性癌细胞SACC-2生长的影响作用及其机制。方法 采用CCK-8法测定红景天甙对体外培养的SACC-2细胞增殖的作用,并绘制细胞生长曲线;采用免疫组化方法检测红景天甙作用后SACC-2细胞中半胱氨酸蛋白酶(Caspase 3和Caspase 8)及增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达情况。结果 根据CCK-8测定法,红景天甙对SACC-2细胞增殖有抑制作用,IC₅₀值为(4.99±0.23) μg/mL。生长曲线显示红景天甙组活细胞数随着培养天数增加而降低;红景天甙组SACC-2细胞的Caspase 3及Caspase 8蛋白表达均呈强阳性表达,对照组均为弱阳性表达,二组间差异显著(P<0.01);红景天甙组SACC-2细胞的PCNA阳性细胞数较对照组少,二组间差异显著(P<0.01)。结论 红景天甙可能抑制了SACC-2细胞增殖及诱发其凋亡,有望成为临床抗癌药物之一。

[关键词] 红景天甙; 唾液腺腺样囊性癌; 半胱氨酸蛋白酶类; 增殖细胞核抗原

[中图分类号] R739.87 [文献标识码] A

Effect of salidroside on salivary adenoid cystic carcinoma cells in vitro LI Mei-hua¹, ZHANG Gui-zhen², WANG Yi-shu³. (1. Dept. of Stomatology, The Third Hospital of Jilin University, Changchun 130031, China; 2. Dept. of Central Research, The Third Hospital of Jilin University, Changchun 130031, China; 3. Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] Objective To study the effect and mechanism of salidroside on salivary adenoid cystic carcinoma (SACC-2) cells in vitro. Methods To detect the effect of salidroside on SACC-2 cells growth with CCK-8 kit, the growth curve of cells were drawn. To detect the expression of cysteine proteinase(Caspase 3 and Caspase 8) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in SACC-2 cells, immunohistochemistry staining was used. Results According the results of CCK-8 kit detected, salidroside could inhibit the proliferation of SACC-2 cells, IC₅₀ value was (4.99±0.23) μg/mL. Growing curve showed that SACC-2 cells of salidroside groups decreased with extending cell culture time. Immunohistochemistry staining showed that Caspase 3 and Caspase 8 were both strong positive expression in SACC-2 cells of salidroside groups, and poor positive expression in SACC-2 cells of control group, the difference was significant(P<0.01). The expression of PCNA was reverse(P<0.01). Conclusion Salidroside could inhibit the proliferation of SACC-2 cells and induce SACC-2 cell apoptosis in vitro, which could be a kind of antitumor medicine in the future.

[Key words] salidroside; salivary adenoid cystic carcinoma; cysteine proteinase; proliferating cell nuclear antigen

唾液腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是最常见的唾液腺恶性肿瘤之一,大约占唾液腺恶性肿瘤的20%^[1],可发生在大小唾液腺中,转移率在口腔颌面部恶性肿瘤中居首位。有报道增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在SACC中有较高的表达^[2],早期SACC

组织中PCNA阳性率高于晚期^[3],表明PCNA阳性率的改变与SACC组织的进展有相关性,PCNA指数可以预测远处转移^[4]。在Caspase家族中Caspase 8为凋亡启动因子,活化的Caspase 8直接激活效应Caspase 2和Caspase 3,而Caspase 3是细胞凋亡的关键性蛋白酶,直接导致凋亡细胞解体。

红景天是一种天然的中草药植物,已有研究显示,红景天对体外培养的人胃腺癌细胞系SGC-7901细胞、肝癌细胞和小鼠腹水瘤S-180细胞均有一定的抑制作用^[5],但目前国内外尚无学者进行系统的红景天抗唾液腺癌的开发研究。本研究主要观察红

[收稿日期] 2007-08-17; [修回日期] 2007-10-18

[基金项目] 吉林省科学技术厅基金资助项目(20030551-10); 中国博士后基金资助项目(2004036399)

[作者简介] 李美华(1963-),女,黑龙江人,主任医师,博士

[通讯作者] 李美华, Tel: 13578947789

景天提取物红景天甙对体外培养的SACC-2细胞生长增殖的影响,以及药物作用后SACC-2细胞中的PCNA、Caspase 3及Caspase 8蛋白表达情况,希望为临床上治疗SACC提供一种对人体毒副作用小的中药制剂。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

人唾液腺腺样囊性癌细胞SACC-2(购于上海中国科学院细胞研究所),红景天甙(由吉林大学基础医学院药物化学教研室提供),PCNA、Caspase 3、Caspase 8多克隆抗体(Cell Signaling公司,美国),SP试剂盒(福州迈新生物试剂公司),CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本),RPMI-1640(Gibico公司,美国)。

1.2 SACC-2细胞培养

SACC-2细胞培养于含体积分数为10%新生牛血清的RPMI-1640培养液中,当细胞生长到达对数生长期,以每毫升 1.4×10^5 个的密度将细胞悬液接种于96孔板,每孔0.2 mL,置37℃、5%CO₂孵箱中培养,24 h后加入梯度质量浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.13、0.625 μg/mL)的红景天甙的培养液,每个质量浓度设3个平行孔,对照孔(未加药)1个,另设空白对照孔(无细胞和无药)3个。重新置于37℃、5%CO₂孵箱中,孵育72 h。

1.3 CCK-8法测定红景天甙对SACC-2细胞生长的抑制作用

倾去孔板内的上清液,各孔加入含CCK-8 10 μL的100 μL无血清培养液,37℃、5%CO₂培养3 h后于酶标仪450 nm处测光密度值。抑制率(%)=(实验孔光密度值-对照组孔光密度值)/空白对照孔光密度值 $\times 100\%$,计算红景天甙对SACC-2细胞的半抑制浓度值(50% inhibiting concentration, IC₅₀)。

1.4 SACC-2细胞在红景天甙不同质量浓度作用下生长曲线的绘制

取对数生长期的细胞,以每毫升 4×10^4 个的密度将细胞悬液接种于24孔板,分6组加药:大剂量组(2 \times IC₅₀)、中剂量组(IC₅₀)、小剂量组(1/2IC₅₀)的红景天甙,阳性对照药5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)组,对照组(不加药)和联合用药组(红景天甙和5-FU),每孔液体量为0.5 mL,每日每组取平行3个孔计数细胞数,分别计4 d的细胞数量,并绘制生长曲线。

1.5 SACC-2细胞爬片的制备

取对数生长期SACC-2细胞,调整细胞悬液密度为每毫升 1×10^5 个,加入已铺载玻片并经多聚赖氨

酸处理过的24孔板内,每孔900 μL。24 h后,对照组加入RPMI-1640培养液(每孔100 μL),实验组每孔加入质量浓度为4.99 μg/mL红景天甙100 μL,继续培养24 h后,用体积分数为4%多聚甲醇固定,而后PBS充分冲洗,晾干,储存于-20℃冰箱中备做免疫组化染色。

1.6 免疫组织化学SP法检测红景天甙作用后SACC-2细胞中半胱氨酸蛋白酶和增殖细胞核抗原蛋白的表达

取出已经制备好的玻片,先在室温平衡,而后进行SP免疫组织化学染色,步骤如下:从培养板中取出载玻片,水化15 min,体积分数为0.1% Triton作用15 min,含体积分数为0.01% Triton的0.01 mol/L PBS冲洗3次,每次5 min,体积分数为0.3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶15 min,含体积分数为0.01% Triton的0.01 mol/L PBS冲洗3次,每次5 min,滴加非免疫动物血清,室温湿盒内孵育15 min,滴加一抗,4℃冰箱过夜, PBS冲洗3 \times 5 min,滴加生物素标记的二抗,室温湿盒内孵育10 min, PBS冲洗3 \times 5 min,滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温湿盒内孵育15 min, PBS冲洗3 \times 5 min,显微镜下控制DAB显色,自来水终止,苏木素复染,明胶甘油封片,结果评价:以细胞胞浆(Caspase 3和Caspase 8)或胞核(PCNA)内出现明显棕黄色染色为阳性标准。

1.7 形态定量分析

Caspase 3和Caspase 8每张爬片首先通过Cooled CCD采集预计数视野图片,而后以Image-Pro Plus Analysis Software在表达阳性切片上使用AOI(area of interest)工具选择图像上的一个区域,把它和图像上其他部分分离开,而后采用Image-Pro程序对AOI区域上的像素进行处理,测量灰度值。每例选择5个不重复视野计数,单位为像素,结果用均数 \pm 标准差表示。

PCNA每张爬片选取不同的3个区域,每个区域随机计数50个细胞,计算PCNA阳性率,PCNA阳性率=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 红景天甙对SACC-2细胞生长的抑制作用

红景天甙对SACC-2细胞生长有抑制作用,其抑制率随红景天甙质量浓度增高而增大(表1)。经SPSS 14.0软件分析,其IC₅₀为(4.99 \pm 0.23) μg/mL。

2.2 红景天甙对SACC-2细胞生长曲线的影响

各组细胞数均随培养天数有所下降,其中对照组(不加药)细胞数在第3天达高峰,随后降低,但细胞数降低并不明显。小剂量组(1/2IC₅₀)和中剂量

组(IC_{50})改变与对照组相似,但细胞数减少较对照组明显。大剂量组($2 \times IC_{50}$)和阳性对照药5-FU组及联合用药组(红景天甙和5-FU)活细胞数随着培养天数增加而降低,说明红景天甙抑制了SACC-2细胞的生长,且随着红景天甙质量浓度的增加,抑制作用愈明显(图1)。

表 1 红景天甙对SACC-2细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 The inhibition rate of salidroside to SACC-2 cells ($\bar{x} \pm s$)

红景天甙质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	抑制率(%)
0.062 5	0.15 \pm 0.07
0.13	1.79 \pm 0.02
0.25	3.47 \pm 0.11
0.5	7.12 \pm 0.29
1	14.18 \pm 0.61
2	37.29 \pm 1.67
4	45.97 \pm 1.52
8	71.59 \pm 1.21

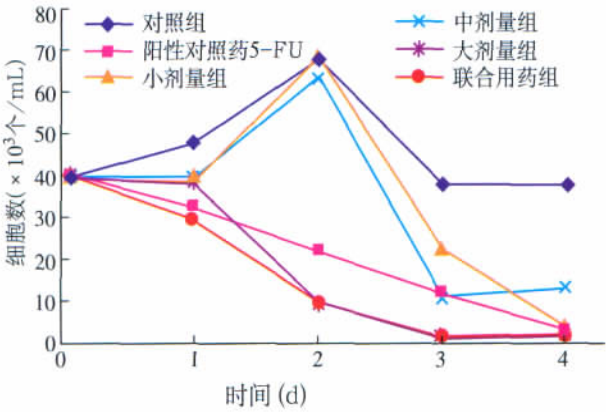


图 1 红景天甙对SACC-2细胞生长曲线的影响
Fig 1 The effect of salidroside on SACC-2 cell growing curve

2.3 SACC-2细胞Caspase 3免疫组化染色结果

免疫组化结果显示,红景天甙实验组(红景天甙剂量4.99 $\mu\text{g/mL}$)SACC-2细胞胞浆有棕黄色颗粒,Caspase 3呈强阳性表达(图2),灰度值为5 479 169 \pm 9 458.32,对照组呈弱阳性表达(图3),灰度值为2 094 639 \pm 5 624.12,二组间比较差异具有显著性($P < 0.01$),说明红景天甙可能诱发SACC-2细胞凋亡。

2.4 SACC-2细胞Caspase 8免疫组化染色结果

免疫组化结果显示,红景天甙实验组(红景天甙剂量4.99 $\mu\text{g/mL}$)SACC-2细胞胞浆内有棕黄色的颗粒,Caspase 8蛋白强阳性表达(图4),灰度值为632 514 \pm 7 896.3,对照组弱阳性表达,灰度值为214 652 \pm 9 653.5,二组间比较差异显著($P < 0.01$),说明红景天甙可能诱发SACC-2细胞凋亡。

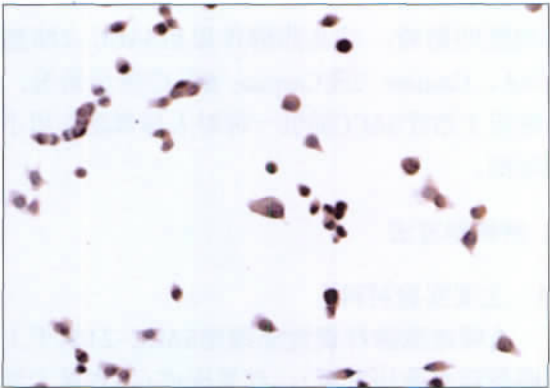


图 2 红景天甙实验组SACC-2细胞胞浆Caspase 3呈阳性表达
SP $\times 100$

Fig 2 Caspase 3 was positive expression in SACC-2 cytoplasm of salidroside experimental group SP $\times 100$

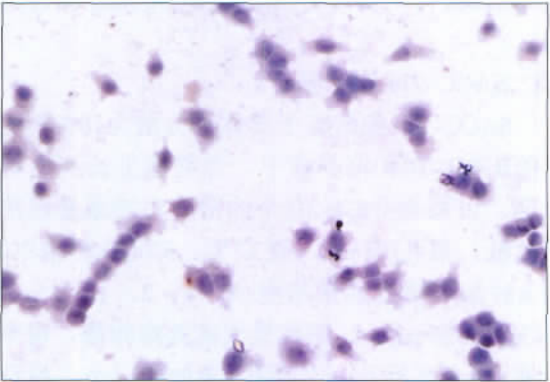


图 3 对照组SACC-2细胞胞浆未见Caspase 3明显阳性表达
SP $\times 100$

Fig 3 Caspase 3 was poor positive expression in SACC-2 cytoplasm of control group SP $\times 100$



图 4 红景天甙实验组SACC-2细胞胞浆Caspase 8呈强阳性表达
SP $\times 100$

Fig 4 Caspase 8 was strong positive expression in SACC-2 cytoplasm of salidroside experimental group SP $\times 100$

2.5 SACC-2细胞PCNA免疫组化染色结果

免疫组化染色结果显示,红景天甙实验组(红景天甙剂量4.99 $\mu\text{g/mL}$)作用后SACC-2细胞PCNA阳性细胞数较对照组少(图5、6),PCNA阳性细胞表达率为75% \pm 1.9%,对照组为94% \pm 1.6%,二组间比较差异显著($P < 0.01$),说明红景天甙抑制了SACC-2细胞PCNA的表达,抑制了SACC-2细胞的增殖。



图5 对照组SACC-2细胞核内PCNA均呈强阳性表达 SP × 100

Fig 5 PCNA was strong positive expression in SACC-2 nucleuses of the control group SP × 100



图6 红景天实验组SACC-2细胞核内PCNA部分呈弱阳性表达 SP × 100

Fig 6 PCNA was poor positive expression in SACC-2 nucleuses of the salidroside experimental group SP × 100

3 讨论

细胞凋亡不仅影响肿瘤的发生,而且与肿瘤的治疗有密切的关系,诱导肿瘤细胞凋亡是多数抗肿瘤药物杀伤肿瘤细胞的重要途径之一^[6],临床上使用的许多化疗药物是通过诱导癌细胞凋亡发挥作用的^[7]。细胞凋亡已成为一种维持机体自身稳定所必需的生理性细胞死亡,机体内细胞在凋亡过程中,严格地受基因调控,如果调控的基因出现了问题,应该死亡的细胞没有死亡,细胞就会继续分裂增殖,导致肿瘤细胞的出现。因此有学者提出,细胞恶性转化或癌细胞的产生均是由细胞增殖与细胞死亡调控功能失调所致^[8]。在Caspase家族中Caspase 8为凋亡启动因子,活化的Caspase 8直接激活效应Caspase 2和Caspase 3^[9-11],而Caspase 3是细胞凋亡的关键性蛋白酶,直接导致凋亡细胞解体,酶解细胞机构蛋白,切断凋亡细胞与周围细胞的联系,关闭DNA的复制与修复,降解DNA分子,最后把细胞酶解并包裹形成凋亡小体。PCNA是一种具有分裂、增殖活性细胞的标志物,是细胞调节蛋白,是DNA

聚合酶的辅助蛋白,也是一种细胞调节蛋白,在激发DNA复制与修复作用中起关键性的作用,随细胞周期而变化,主要出现在增殖的细胞中,在细胞有丝分裂的G₁期和S期合成,量的变化与DNA合成一致,是评价细胞增殖状态的客观指标,目前广泛应用于恶性肿瘤细胞增殖的研究^[12]。

红景天是一种天然的中草药植物,具有广泛的药理作用。红景天有效成分是从红景天根中提取的,其主要有效成分为红景天甙。

本研究将红景天甙作用于体外培养的SACC-2细胞,首先采用CCK-8法测定红景天甙对SACC-2细胞增殖的作用,结果显示红景天甙对SACC-2细胞生长有抑制作用,其IC₅₀值为(4.99 ± 0.23) μg/mL;进一步绘制红景天甙对SACC-2细胞作用的细胞生长曲线,结果显示红景天甙组活细胞数随着细胞培养天数增加而减少,说明红景天甙抑制了SACC-2细胞的生长,且随着红景天甙质量浓度的增加,抑制作用明显增强;在研究红景天甙对SACC-2作用机制时,本实验采用免疫组化方法,观察PCNA、Caspase 3及Caspase 8的表达情况,结果显示红景天甙实验组SACC-2细胞中Caspase 3及Caspase 8均呈强阳性表达,而对照组均为弱阳性表达,二组间差异显著(P<0.01),此结果提示红景天甙可通过一定的途径诱导Caspase 8及Caspase 3,导致SACC-2细胞的凋亡;而PCNA免疫组化结果显示红景天甙作用后,SACC-2细胞中PCNA阳性细胞数较对照组明显少(P<0.01),表明红景天甙对SACC-2细胞的增殖起到了抑制作用。本研究首次系统研究红景天甙对唾液腺腺样囊性癌细胞生长的影响,并采用了先进的CCK-8检测法替代传统的MTT检测法来观察其抑制率,具有创新性,同时在此基础上进行了PCNA、Caspase 3及Caspase 8免疫组化染色,进一步研究了红景天甙诱发唾液腺腺样囊性癌细胞凋亡及抑制其生长增殖的作用机制,使研究系统化。

[参考文献]

- [1] Spiro RH. Salivary neoplasms: Overview of a 35-year experience with 2 807 patients[J]. Head Neck Surg, 1986, 8(3):177-184.
- [2] 黎明,田卫东,危群,等.腮腺癌中增殖细胞核抗原的表达及其意义[J].昆明医学院学报,2002,23(2):14-16.
LI Ming, TIAN Wei-dong, WEI Qun, et al. Expression and significance of PCNA in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of parotid gland[J]. Academic J Kunming Medical College, 2002, 23(2):14-16.
- [3] 刘锋,马敏,张佐,等.涎腺腺样囊性癌中P16蛋白、增殖细胞核抗原表达与病理分型、临床分期和远处转移的关系[J].

蛋白10 b、骨形态发生蛋白-2^[11]、骨形态发生蛋白受体- A和- AB^[12]等都有明显表达。同时,也在同一时期的中间细胞层中观察到Syndecan- 1的强阳性分布;不仅如此,在处于分化中的前成釉细胞和成牙本质细胞的顶端,也有Syndecan- 1的阳性表达。有文献报道, Syndecan- 1表达的下调能够导致上皮细胞极化的丢失,而Syndecan- 1的过度表达又能抑制成纤维细胞生长因子- 2诱导的细胞增殖^[13]。Syndecans可能通过与生长因子的结合,作为细胞增殖和分化的基本调节因素起作用,从而调节发育过程^[1,14]。推测Syndecan- 1可能与其他信号分子合作,共同调节牙胚细胞的增殖和牙体形成细胞的分化,进而影响牙齿的发育与形成。

此外,在牙胚成釉器与口腔上皮相联系的部位(笔者称其为蒂部)也发现有Syndecan- 1的阳性分布,并且在帽状期时呈现偏于颊侧的特点。Syndecan- 1的这种不对称分布是否与牙齿形态的不对称性有关?这个被称作蒂部的部位在牙胚发育过程中的地位如何?有关这些问题尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Bernfield M, Gotte M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans[J]. Annu Rev Biochem, 1999, 68 (1) :729- 777.
- [2] Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling[J]. FASEB J, 1999, 13(Suppl) :S91- S100.
- [3] Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1997, 8(1) :4- 39.
- [4] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental dev-

elopment[J]. Mech Dev, 1997, 67(2) :111- 123.

- [5] Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation[J]. Adv Dent Res, 2001, 15(1) :14- 18.
- [6] Thesleff I, Jalkanen M, Vainio S, et al. Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial- mesenchymal interaction during tooth morphogenesis[J]. Dev Biol, 1988, 129(2) :565- 572.
- [7] Bai XM, Van der Schueren B, Cassiman JJ, et al. Differential expression of multiple cell- surface heparan sulfate proteoglycans during embryonic tooth development[J]. J Histochem Cytochem, 1994, 42(8) :1043- 1054.
- [8] Vainio S, Jalkanen M, Vaahtokari A, et al. Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis[J]. Dev Biol, 1991, 147(2) :322- 333.
- [9] Elenius K, Jalkanen M. Function of the syndecans—a family of cell surface proteoglycans[J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 11) :2975- 2982.
- [10] Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors[J]. Cell, 1995, 83(3) :357- 360.
- [11] Nadiri A, Kuchler- Bopp S, Haikel Y, et al. Immunolocalization of BMP- 2/- 4, FGF- 4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar[J]. J Histochem Cytochem, 2004, 52(1) :103- 112.
- [12] Nadiri A, Kuchler- Bopp S, Perrin- Schmitt F, et al. Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar[J]. Cell Tissue Res, 2006, 324(1) :33- 40.
- [13] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: New kids on the signaling block[J]. Circ Res, 2005, 96(5) :488- 500.
- [14] Rapraeger AC. Molecular interactions of syndecans during development[J]. Semin Cell Dev Biol, 2001, 12(2) :107- 116.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第315页)

华西口腔医学杂志, 2005, 23(1) :86- 87.

- LIU Feng, MA Min, ZHANG Zuo, et al. The relationship of P16, the expression of PCNA and the types of pathology, clinical staging and distant metastasis on salivary adenoid cystic carcinoma cells[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(1) :86- 87.
- [4] Kim KH, Chung PS, Rhee CS, et al. The manifestation of proliferating cell nuclear antigen in adenoid cystic carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994, 120(11) :1221- 1225.
- [5] 赵文, 蒋东生, 边庆荣, 等. 蔷薇红景天对小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用[J]. 营养学报, 2000, 22(1) :90- 91.
- ZHAO Wen, JIANG Dong- sheng, BIAN Qing- rong, et al. Effects of rhodiola rosea on immune function and its antitumor action in mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2000, 22(1) :90- 91.
- [6] 马杰, 宗志红, 王兆元, 等. Genistein对涎腺腺样囊性癌细胞生长及Survivin表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(1) :97- 99.
- MA Jie, ZONG Zhi- hong, WANG Zhao- yuan, et al. Effects of Genistein on the proliferation and expression of Survivin in salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC- 83[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(1) :97- 99.

- [7] Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold [J]. Cell, 1994, 78(4) :539- 542.
- [8] 计春燕, 谭诗云, 刘长青, 等. 丹皮酚对人大肠癌细胞凋亡和细胞周期以及患者预后的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(6) :1222- 1241.
- Ji Chun- yan, TAN Shi- yun, LIU Chang- qing, et al. Effect of paeonol on apoptosis and cell cycle of human colorectal cancer cells as well as prognosis of patients[J]. Chinese J Clinical Rehabilitation, 2005, 9(6) :1222- 1241.
- [9] Mignotte B, Vayssie JL. Mitochondria and apoptosis[J]. Eur J Biochem, 1998, 252(1) :1- 15.
- [10] Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell- free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c [J]. Cell, 1996, 86(1) :147- 157.
- [11] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995, 267(5203) :1449- 1456.
- [12] Sato I, Sunohara M, Mikami A, et al. Immunocytochemical study of the maxilla and maxillary sinus during human fetal development[J]. Okajimas Folia Anat Jpn, 1998, 75(4) :205- 216.

(本文编辑 汤亚玲)