

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.010

· 基础研究 ·

CXCR4-shRNA 纳米复合微粒对肾癌细胞增殖的抑制作用

董勤¹, 叶春林¹, 高峰¹, 崔杰¹, 陈培¹, 王少良¹, 蔡晨² (1. 武警上海总队医院 肾内科, 上海 201103; 2. 第二军医大学长海医院 特需诊疗科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 制备聚酰胺胺型树枝状分子 (polyamidoamine dendrimer, PAMAM-D) 载送 CXCR4-shRNA 的纳米复合微粒 (PAMAM-shRNA), 研究其在体外抑制人肾癌 A498 细胞增殖的效应。 **方法:** 将第 7 代的 PAMAM-D 室温下与 CXCR4-shRNA 混合 (质量比为 1:0.73), 制备成纳米球形分子与 CXCR4-shRNA 的纳米复合物 PAMAM-shRNA, 采用透射电镜观察 PAMAM-shRNA 的形态结构, 激光粒径仪测定其粒径。分别以 PAMAM-shRNA、CXCR4-shRNA 和 PAMAM-D 转染 A498 细胞, MTT 法检测 PAMAM-shRNA 对肾癌细胞 A498 增殖的抑制作用, 流式细胞术检测 PAMAM-shRNA 诱导 A498 细胞的凋亡情况, Real-time PCR 分析转染后肾癌 A498 细胞 *CXCR4* mRNA 的表达水平。 **结果:** 成功制备的新型纳米复合微粒 PAMAM-shRNA 分散性好, 不粘连, 其平均粒径为 (176.5 ± 25.48) nm。PAMAM-shRNA 可以有效地抑制人肾癌细胞 A498 的增殖, 且随着 PAMAM-shRNA 浓度和药物作用时间的增加, 细胞增殖抑制的效果越明显, 其最高增殖抑制率达 $(66.5 \pm 2.7)\%$; 其还可加强诱导肾癌 A498 细胞凋亡。Real-time PCR 检测结果表明, 与 CXCR4-shRNA 组相比, PAMAM-shRNA 组的 *CXCR4* mRNA 的表达水平明显下降 $[(0.29 \pm 0.035) \text{ vs } (0.70 \pm 0.084)], P < 0.05$ 。 **结论:** PAMAM-D 能高效递送 CXCR4-shRNA 进入 A498 细胞, PAMAM-shRNA 以剂量和时间依赖方式显著抑制肾癌细胞增殖和诱导肾癌细胞凋亡, 其在肿瘤基因治疗中具有潜在的应用价值。

[关键词] 聚酰胺胺型树枝状分子; CXCR4; 短发夹 RNA; 肾癌

[中图分类号] R737.11; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)01-0057-05

Inhibitory effect of polyamidoamine dendrimer-CXCR4-shRNA nanoparticles on the proliferation of renal carcinoma cells

Dong qin¹, Ye Chunlin¹, Gao Feng¹, Cui Jie¹, Chen Pei¹, Wang Shaoliang¹, Cai Chen² (1. Department of nephrology, Shanghai Municipal Corps Hospital, People's Armed Police Forces, Shanghai 201103, China; 2. Department of Special Diagnoses, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the preparation of polyamidoamine dendrimer-CXCR4-shRNA nanoparticles (PAMAM-shRNA) and study the inhibitory effect of PAMAM-shRNA nanoparticles on the proliferation of renal carcinoma cells in vitro. **Methods:** The seventh generation of polyamidoamine dendrimer (PAMAM-D) and CXCR4-shRNA were mixed at a mass ratio of 1:0.73 at room temperature. The morphology and structure of PAMAM-shRNA by transmission electron microscopy, and determined the size of the nanoparticles were analyzed by laser particle size analyzer. Human renal carcinoma A498 cells were transfected with PAMAM-shRNA, CXCR4-shRNA and PAMAM-D respectively. After transfection, cell viability was assessed by MTT assays, cell apoptosis by flow cytometry, and *CXCR4* mRNA abundance by Real-time PCR. **Results:** The prepared PAMAM-shRNA nanoparticles were evenly distributed and non-adherent with a mean diameter of 176.5 ± 25.48 nm. PAMAM-shRNA effectively inhibited A498 proliferation in time- and dose-dependent manners, and the highest proliferation inhibition rate was up to $(66.5 \pm 2.7)\%$. PAMAM-shRNA induced A498 cell apoptosis. *CXCR4* mRNA abundance was significantly decreased ($P < 0.05$) in cells transfected with PAMAM-shRNA (0.29 ± 0.035) than in cells transfected with CXCR4-shRNA (0.70 ± 0.084). **Conclusions:** PAMAM dendrimers may efficiently mediate the entry of CXCR4-shRNA into renal carcinoma cells, where they exert proliferation-inhibitory and apoptosis-pro-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81202019); 上海市卫生局青年科研资助项目 (No. 2011Y197)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202019), and the Youth Research Project of Shanghai Health Bureau (No. 2011Y197)

[作者简介] 董勤 (1978 -), 男, 浙江省绍兴市人, 主治医师, 主要从事肾脏肿瘤防治的基础和临床研究, E-mail: dxgf159632@163.com

[通信作者] 蔡晨 (Cai Chen, Corresponding author), E-mail: 13764182039@163.com

moting activities. These observations suggest that PAMAM-shRNA nanoparticles may have a potential clinical application in gene therapy of renal cancer.

[**Key words**] polyamidoamine-dendrimer; CXCR4; short hairpin RNA; renal carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 57-61]

基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor1, SDF-1)是趋化因子家族的一个新成员,其唯一的受体趋化因子受体 4(chemokine receptor 4, CXCR4)在机体许多组织和器官中广泛表达^[1-2]。近年研究^[3-4]表明, SDF-1/CXCR4 生物学轴在肾癌细胞的转移、凋亡等方面发挥着重要的作用, CXCR4 的过度表达,可以促进肾癌细胞的增殖,而抑制 CXCR4 的表达则可诱导肾癌细胞凋亡,并对肾癌的转移起到抑制作用。RNA 干扰技术是一种新型的基因治疗技术,被广泛用于各类肿瘤的治疗研究,通过与靶 RNA 碱基配对,调控基因的表达。国内外研究^[5-6]表明,某些 siRNA 可以起到靶向调节癌基因的表达,抑制肿瘤生长和进展的作用,与肿瘤细胞的增殖和血管生成等多种关键性生物学过程有关。一种好的 RNA 递送系统需要具备多种能力,如保护 RNA 不被各种酶的降解,靶向递送至靶细胞,增强靶细胞的胞内摄取等。随着纳米技术在生物医药领域中的广泛运用,将纳米技术与基因载药系统相结合,产生了多种新型的靶向载药系统^[7-8],其中聚酰胺胺型树枝状分子(polyamidoamine dendrimer, PAMAM-D)作为一种最新的载药系统受到了国内外学者的广泛重视。该载体呈树枝状结构,具有缓慢释放药物、增加靶细胞对药物的摄入、对人体低毒等优点^[9-10]。本研究以 CXCR4 基因为靶点,将纳米技术与 RNA 干扰技术相结合,在细胞水平研究纳米微粒复合物对 A498 肾癌细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

人肾癌细胞株 A498 为第二军医大学国际合作肿瘤研究所赠送,用完全 RPMI 1640 培养液(内含 10% 小牛血清),在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育培养,3~4 d 传代一次,取对数生长期细胞进行实验。

CXCR4-shRNA 由上海吉玛制药技术有限公司根据 CXCR4 在 GenBank 数据库中的登陆号(NM-003467)及合成 shRNA 的设计原则设计合成[序列为: 5'-CACCGAAGCATGACGGACAAGTATTCAAGAGATACTTGTCCGTCATGCTTCTTTTTTTG-3'(sense)和 5'-GATCCAAAAAAGAAGCATGACGGACAAGTATCTCTTGAATACTTGTCCGTCATGCTTC-3'(antisense)]。

PAMAM-D(G7 代,直径 8 nm)购于美国 Sigma 公司,反转录试剂盒、原位凋亡细胞检测试剂盒、内参照 GAPDH 的 Real-time PCR 特异引物均购自上海生物工程有限公司,其他试剂购于上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 纳米复合微粒的制备及其形态学观察

将 CXCR4-shRNA 与 PAMAM-D 按 1:0.73(质量比)投入无血清培养液中,孵育 10 min(室温)后即可获得 CXCR4-shRNA 纳米复合物微粒(简称为 PAMAM-shRNA)。滴 1~2 滴纳米微粒混悬液于铜网上,用 2% 磷钨酸溶液进行染色,将铜网上的纳米微粒室温下晾干,透射电镜观察纳米微粒的形态并拍照。同时取适量 PAMAM-shRNA 混悬液,加注射用水分散,通过激光粒径仪测定纳米微粒的平均粒径及分布情况。

1.3 MTT 法检测 PAMAM-shRNA 对肾癌 A498 细胞增殖的抑制

将对数生长期的 A498 细胞以 5×10^4 个/孔接种在 96 孔细胞培养板中,每孔加入 200 μ l 的 RPMI 1640 液,待细胞贴壁后用于实验。实验分为三组:第 1 组加 CXCR4-shRNA 溶液(其浓度分别为 0.1、1.0、10 μ mol/L),第 2 组加 PAMAM-shRNA 纳米微粒溶液(其 CXCR4-shRNA 实际浓度与第 1 组相同),第 3 组加 PAMAM-D 溶液(其 PAMAM-D 的质量分别与第 2 组中不同浓度的 PAMAM-shRNA 溶液中所含有的 PAMAM-D 的质量对应相同),每组均设 3 复孔。各组分别在加药后 24、48、72 h 加入 MTT 溶液继续培养 4 h,去除上清液,加入 DMSO 150 μ l/孔,轻微震荡使结晶溶解后,立即用酶标仪在 570 nm 波长处测定光密度(*D*)值,并计算抑制率。抑制率(%) = (1 - 实验组平均 D_{570} / 对照组平均 D_{570}) \times 100%。实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测 PAMAM-shRNA 对肾癌 A498 细胞周期的影响

将 A498 细胞按 1×10^6 个/瓶接种于培养瓶中,培养 1 d 后,实验分 3 组,第 1 组加入 10 μ mol/L 的 CXCR4-shRNA 溶液,第 2 组加入含相同 shRNA 浓度的 PAMAM-shRNA 纳米微粒溶液,第 3 组加入与第 2 组同质量的 PAMAM-D 完全培养液,48 h 后收集培养瓶内贴壁及悬浮的细胞,0.25% 胰酶消化,PI

染色,流式细胞术测定 DNA 含量,进行细胞周期分析。实验重复 3 次。

1.5 Real-time PCR 检测转染后 A498 细胞 CXCR4 mRNA 的表达

将 A498 细胞按 5×10^6 个/皿接种到培养皿内,待 A498 细胞生长到 80% 融合时,除去原有的培养液,在每个培养皿内分别重新加入 3 ml 新鲜培养液及 3 组药物(同方法 1.4),以不加药物为空白对照组,经过 48 h 培养后,收集细胞, -80°C 保存。然后按照试剂盒说明书进行提取细胞总 RNA 及逆转录 cDNA 操作,数据采用仪器自带软件(ABI Prism 7300)进行分析。其中 CXCR4 两端引物序列分别为:5'-GGAAAAGAGGGGAGGAGAG-3'(sense)和 5'-CACTTCCAATTCAGCAAGCA-3'(antisense);内参照 GAPDH 的两端引物序列分别为:5'-AAGGT-CATCCCTGAGCTGAA-3'(sense)和 5'-ACCCA-GAAGACTGTGGATGG-3'(antisense)。每个样品靶基因的相对 mRNA 表达水平按下列公式计算: mRNA 表达 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

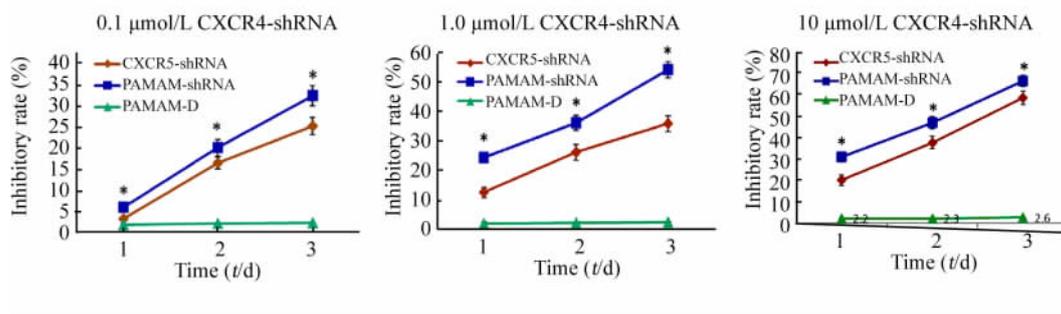


图 2 不同浓度的 CXCR4-shRNA 及 PAMAM-shRNA 对 A498 细胞增殖的影响

Fig. 2 Influence of different concentration of CXCR4-shRNA and PAMAM-shRNA on the proliferation of A498 cells

* $P < 0.05$ vs CXCR4-shRNA group

2.3 PAMAM-shRNA 对肾癌 A498 细胞周期及凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图 3)显示, CXCR4-shRNA、PAMAM-shRNA 和 PAMAM 等 3 组分别经不同药物作用 48 h 后, A498 细胞的凋亡率分别为 $(7.91 \pm 0.35)\%$ 、 $(19.26 \pm 1.06)\%$ 、 $(5.18 \pm 0.29)\%$ 。同时流式细胞检测发现, PAMAM-shRNA 组处于 G_0/G_1 期的 A498 细胞比例减少, 而 $S + G_2/M$ 期的 A498 细胞比例增多。

2.1 PAMAM-shRNA 的形态学特征及粒径大小

透射电镜观察结果(图 1)表明, 本研究成功制备了 PAMAM-shRNA, 该纳米复合微粒呈不规则椭圆形, 微粒之间分散性好, 无粘连, 其平均粒径为 (176.5 ± 25.48) nm, 符合纳米水平标准。

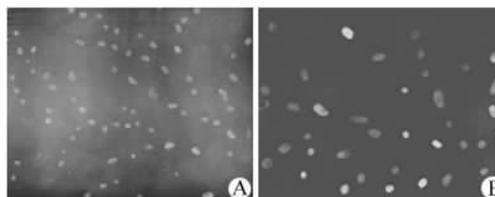


图 1 透射电镜观察 PAMAM-shRNA 的形态特征

Fig. 1 Observed the morphological characteristics of PAMAM-shRNA by transmission electron microscopy

A: $\times 30\ 000$; B: $\times 50\ 000$

2.2 PAMAM-shRNA 抑制肾癌 A498 细胞的增殖

MTT 法检测结果(图 2)显示, PAMAM-shRNA 可明显抑制肾癌 A498 细胞的增殖, 且随着药物作用时间的延长和药物浓度的增加, 其抑制效果越明显。在相同的药物浓度及同样的作用时间下, PAMAM-shRNA 对 A498 细胞的抑制作用要超过 CXCR4-shRNA 组 ($P < 0.05$)。

M 期的 A498 细胞比例增多。

2.4 PAMAM-shRNA 抑制肾癌 A498 细胞 CXCR4 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果表明, 与 CXCR4-shRNA 组及 PAMAM-D 组相比, PAMAM-shRNA 组的 CXCR4 mRNA 的表达水平明显下降 [(0.29 ± 0.031) vs (0.70 ± 0.084) 、 (0.93 ± 0.106)], 均 $P < 0.05$]。

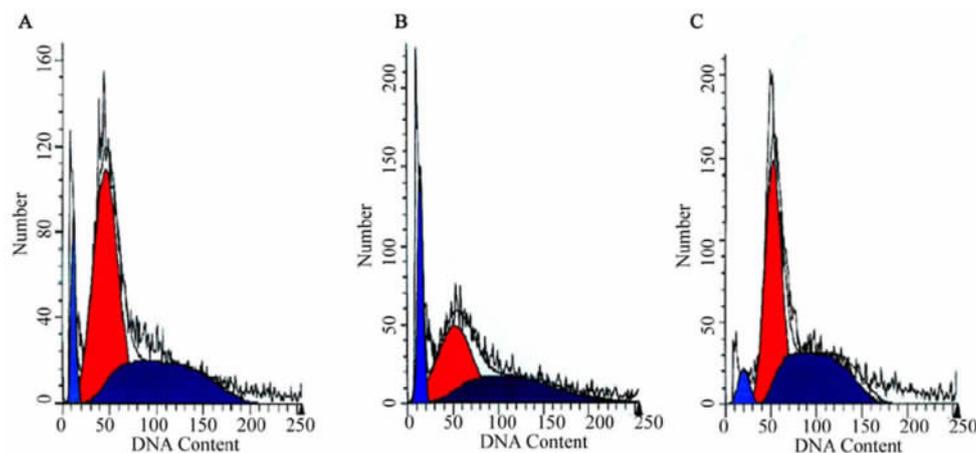


图3 经流式细胞术检测的 A498 细胞凋亡和周期峰的变化

Fig. 3 The apoptosis and the changes of cycle peak of A498 cells determined flow cytometry

A: Treated with CXC4-shRNA for 48h; B: Treated with PAMAM-shRNA for 48h; C: Treated with PAMAM-D for 48 h

3 讨论

肾细胞癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤,不少患者在发现时已经出现远处转移,甚至在部分手术后患者中亦有复发、转移的现象发生,直接影响患者的预后。因此,针对转移性肾癌的研究是目前泌尿系统恶性肿瘤的研究热点之一。国内外不少研究^[11-12]已经表明,CXCR4 在肾癌细胞中存在过度表达,阻断 CXCR4 的表达可以明显减少肾癌细胞的增殖及转移能力,促进肾癌细胞的凋亡。目前抑制基因表达的方法多种多样,而 RNA 干扰技术是目前较为热门的方法之一,已被用于多种肿瘤的基因治疗^[13-14],但是在肾癌治疗方面有关运用 RNA 干扰技术抑制 CXCR4 表达的研究并不多见。过去常用的 shRNA 载体包括病毒载体、脂质体载体等,其不同的载体各有利弊,如脂质体的传递效率较低,也易产生炎症反应,而病毒载体引起机体产生免疫反应的现象则较为突出。随着纳米技术的蓬勃发展,特别在肿瘤的基因治疗方面,纳米载体的出现越来越受到广大医务工作者的重视^[15-16]。这些纳米载体多具有携带药物剂量较大、生物相容性好、药物缓释性强和在人体内可降解成无害物质等多方面的优点,受到国内外学者的一致认可^[17-18],而 PAMAM-D 就是这样一种具有独特树枝结构的纳米载体。

本研究采用 PAMAM-D 作为 shRNA 载体,构建 PAMAM-shRNA 纳米微粒复合物,通过 RNA 干扰技术,用于抑制 CXCR4 的表达,从而达到减少肾癌细胞增殖,促进细胞凋亡的作用。PAMAM-D 与 shRNA

纳米微粒的结合主要是通过 PAMAM-D 的胺基团和 siRNA 的磷酸盐基团正负电荷吸引的静电作用而形成的。因此,该纳米微粒的制备较为简单,制备过程的简化程度明显优于病毒、脂质体等载体。但是 PAMAM-D 本身价格较为昂贵,严重束缚了其作为药物系统的运用,相信随着高分子材料制备技术的不断完善,这个难题可望得到解决。本研究成功制备了 PAMAM-shRNA 纳米微粒复合物,通过透射电镜可以发现该纳米微粒分散性好、互相之间无粘连,且其平均粒径为 (176.5 ± 25.48) nm,达到纳米水平,符合静脉用药的标准。MTT 检测可发现,PAMAM-shRNA 组抑制肾癌细胞增殖的作用要明显优于 shRNA 组,且浓度越大、时间越长,其抑制增殖的效果越明显。但是 PAMAM-shRNA 纳米微粒与其他纳米载药系统不同,其并不是通过在细胞外缓慢释放 shRNA 后,再通过 shRNA 来达到抑制细胞增殖的作用;PAMAM-shRNA 是作为一个整体,直接进入细胞内,从而发挥作用,且 PAMAM-D 本身带有正电荷,可以与细胞膜表面的负电荷相吸引,起到促进细胞吞噬纳米微粒的作用;同时作为具有独特树枝状结构的高分子纳米物质,又可以诱导细胞表面形成纳米孔,从而实现穿越各种屏障的作用,增加了 shRNA 进入细胞的数量。本实验结果表明,在相同作用时间下,PAMAM-shRNA 组抑制肾癌细胞增殖的作用要优于 CXCR4-shRNA 组,而 PAMAM-D 微粒对于 A498 细胞增殖的抑制作用与空白对照组相比并无区别,证明了 PAMAM-shRNA 抑制细胞增殖的作用并不是通过 PAMAM-D 来完成的;在相同的条

件下,PAMAM-shRNA 组诱导细胞的凋亡率要明显高于 CXCR4-shRNA 组 $[(19.26 \pm 1.06)\% \text{ vs } (7.91 \pm 0.35)\%, P < 0.05]$; 本实验所设计的 shRNA 可以抑制 CXCR4 的表达, 表现为 CXCR4 mRNA 的表达明显减少, 而 PAMAM-shRNA 组的效果更佳明显, 说明 PAMAM-D 可以较好地携带 shRNA 进入细胞, 起到阻止 CXCR4 表达的作用。

综上所述, 本研究结果表明, 抑制 CXCR4 的表达可以起到抑制肾癌细胞增殖的作用, 提示 CXCR4 对肾癌细胞的增殖起到了正向调节的作用。PAMAM-D 可以作为 RNA 干扰技术的载体之一, 起到携带 shRNA 进入细胞的作用, 且 PAMAM-shRNA 的抑制效果要明显优于 shRNA, 在体外增强了 RNA 干扰技术抗肿瘤的效果, 为 RNA 干扰技术载体的选择提供了一个较好的参考, 具有一定的运用前景。但是 CXCR4 诱导肾癌细胞增殖的具体机制, 以及 PAMAM-D 如何更好地实现肾癌的靶向治疗等问题还值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jin F, Hagemann N, Schäfer ST, et al. SDF-1 restores angiogenesis synergistically with VEGF upon LDL exposure despite CXCR4 internalization and degradation [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100(3): 481-491.
- [2] Cai C, Wang LH, Dong Q, et al. Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma [J]. *Tissue Antigens*, 2013, 82(3): 165-170.
- [3] Wang L, Huang T, Chen W, et al. Silencing of CXCR4 by RNA interference inhibits cell growth and metastasis in human renal cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(6): 2043-2048.
- [4] D'Alterio C, Consales C, Polimeno M, et al. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(7): 772-781.
- [5] Bhardwaj A, Singh S, Singh AP. MicroRNA-based cancer therapeutics: Big hope from small RNAs [J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2010, 2(5): 213-219.
- [6] Zhang G, Wang Q, Xu R. Therapeutics based on microRNA: A new approach for liver cancer [J]. *Curr Genomics*, 2010, 11(5): 311-325.
- [7] Ranganath SH, Fu Y, Arifin DY, et al. The use of submicron/nanoscale PLGA implants to deliver paclitaxel with enhanced pharmacokinetics and therapeutic efficacy in intracranial glioblastoma in mice [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(19): 5199-5207.
- [8] de Martimprey H, Bertrand JR, Malvy C, et al. New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(3): 498-509.
- [9] Gu L, Wu Zh, Qi X, et al. Polyamidomine dendrimers: An excellent drug carrier for improving the solubility and bioavailability of puerarin [J]. *Pharm Dev Technol*, 2013, 18(5): 1051-1057.
- [10] Tsai YJ, Hu CC, Chu CC, et al. Intrinsically fluorescent PAMAM dendrimer as gene carrier and nanoprobe for nucleic acids delivery: bioimaging and transfection study [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(12): 4283-4290.
- [11] Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, et al. CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis [J]. *Stem Cells*, 2013, 31(8): 1467-1476.
- [12] Wang L, Wang L, Yang B, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(8): 1049-1054.
- [13] Ku SH, Kim K, Choi K, et al. Tumor-Targeting multifunctional nanoparticles for siRNA delivery: Recent advances in cancer therapy [J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3(8): 1182-1193.
- [14] Yang XC, Wang X, Luo L, et al. RNA interference suppression of A100A4 reduces the growth and metastatic phenotype of human renal cancer cells via NF- κ B-dependent MMP-2 and bcl-2 pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(12): 1669-1680.
- [15] Zanin H, Hollanda LM, Ceragioli HJ, et al. Carbon nanoparticles for gene transfection in eukaryotic cell lines [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 39: 359-370.
- [16] Apolaza PS, Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, et al. A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases [J]. *Int J Pharm*, 2014, 465(1/2): 413-426.
- [17] Ji XT, Huang L, Huang HQ. Construction of nanometer cisplatin core-ferritin (NCC-F) and proteomic analysis of gastric cancer cell apoptosis induced with cisplatin released from the NCC-F [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(11): 3145-3157.
- [18] Liu J, Jiang Z, Zhou J, et al. Enzyme-synthesized poly(amine-co-esters) as nonviral vectors for gene delivery [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(2): 456-465.

[收稿日期] 2014 - 10 - 21 [修回日期] 2014 - 12 - 18

[本文编辑] 阮芳铭

欢迎登录《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 www.biother.org