

6周有氧运动对高脂饲养大鼠性激素及组织芳香化酶表达量的影响*

孙景权¹ 赵 岩¹ 谢敏豪² 严 翊^{1,3}

摘要

目的:观察高脂膳食对雄性大鼠性激素、性腺和性腺外组织中芳香化酶表达量的影响及自由转轮运动的干预效果,探讨有氧运动影响高脂膳食大鼠性激素水平的可能机制。

方法:40只3周龄雄性SD大鼠随机分为4组:普通膳食对照组(C组)、普通膳食运动组(E组)、高脂膳食组(D组)、高脂膳食运动组(ErD组)。E、ErD两组进行自由转轮运动,每天2h,每周训练5天。6周后腹主动脉取血,制备血清,并取睾丸、肝脏、股四头肌和肾脏,检测总睾酮(T)和雌二醇(E₂)含量,并检测组织中芳香化酶(P450 arom)的表达情况。

结果:①与C组相比,D组大鼠血清T显著降低($P < 0.05$),E₂显著升高($P < 0.05$);与D组相比,ErD组大鼠T水平升高,但是无显著性,E₂水平明显下降($P < 0.05$)。②与C组相比,D组大鼠睾丸和股四头肌中P450 arom表达量显著升高($P < 0.05$),肝脏和肾脏中非常显著性升高($P < 0.01$);与D组相比,ErD组大鼠睾丸和肾脏中P450 arom表达量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$),肝脏和股四头肌中也出现降低,但差异不明显($P > 0.05$)。

结论:高脂膳食可引起雄性大鼠睾酮水平降低和雌二醇水平增高。6周自由转轮运动一定程度上改善了高脂膳食诱发的性激素水平异常现象,其作用可能与降低性腺(睾丸)及性腺外组织芳香化酶的表达有关。

关键词 高脂膳食;自由转轮运动;性激素;P450 arom

中图分类号:R493,G804 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-06-0643-06

The effect of six weeks aerobic exercise on sex hormone and P450 arom expression of tissues in male rats with high fat diet/SUN Jingquan, ZHAO Yan, XIE Minhao, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(6): 643—648

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of high fat diet on sex hormones and expression of P450 arom in gonad and extragonadal tissues and the effect of voluntary wheel running treatment of them.

Method: Forty male 3-week-old SD rats were randomly divided into following groups: control group fed with normal diet (C), exercise group fed with normal diet (E), diet group fed with high fat diet (D), exercise and diet group treated with exercise and high fat diet (ErD). E and ErD groups were assigned to play running wheel freely. 2 times/d, 1h/time, 5d/w, 6 weeks in total. 6 weeks later, after the rats had been adequately anesthetized with pentobarbital sodium, blood sample was obtained. Then, testis, liver, quadriceps femoris, and kidney were rapidly excised. Serum T and E₂ were determined. And the protein expression of P450 arom was later analyzed.

Result: ①Compared with C group, serum T significantly decreased in D group ($P < 0.05$), and serum E₂ obviously increased in D group ($P < 0.05$). Compared with D group, serum T in ErD group was high, but the dif-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.06.007

*基金项目:国家自然科学基金青年项目(30800541)

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京,100084; 2 国家体育总局运动医学研究所; 3 通讯作者

作者简介:孙景权,男,博士研究生; 收稿日期:2016-01-28

ference was not significant ($P>0.05$), serum E_2 significantly decreased in ErD group ($P<0.05$). ② Compared with C group, the expression of P450 arom in testis and quadriceps femoris were significantly higher ($P<0.05$) in D group, the expression of P450 arom in liver and kidney were very significantly higher ($P<0.01$); Compared with D group, the expression of P450 arom in testis and kidney significantly decreased ($P<0.01$, $P<0.05$) in the ErD group, the expression of P450 arom in liver and quadriceps femoris also decreased, but the difference was not significant ($P>0.05$).

Conclusion: High fat diet induces the unbalance of T and E_2 . 6 weeks voluntary wheel running improves the phenomenon of the metabolism disorder of T and E_2 induced by high fat diet at certain extent, which may be involved in the decrease of the P450 arom protein in gonad and extragonadal tissues.

Author's address Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word high fat diet; voluntary wheel running exercise; sex hormone; P450 arom

能量过剩是导致体重增加进而诱发慢性代谢性疾病的重要原因之一。8周的高脂饲养可导致青春雄性大鼠血清睾酮水平和睾丸重量显著降低^[1]。高脂饮食会影响大鼠下丘脑-垂体-性腺轴的功能,进而影响性发育。人体实验发现营养过剩的男性儿童青少年也出现“雌雄激素比例失调”、“垂体-性腺轴功能紊乱”等发育异常的现象,严重影响到儿童青少年的生长发育^[2]。目前,关于高脂膳食诱发儿童青少年性激素比例失调及性发育异常的研究较少。

P450 arom是催化雄激素不可逆转地转化为雌激素的限速酶。因此,P450 arom活性大小直接关系到睾酮/雌激素比例,是调节睾酮与雌激素比例的重要酶。男性雌激素的50%—75%是由睾酮在外周组织中经芳香化酶作用转化而来^[3]。而能量过剩引发性激素代谢紊乱是否与芳香化酶的高表达存在因果关系,目前尚无定论。

运动作为一种应激因素,可影响机体绝大多数腺体激素的分泌。动物实验发现,长时间大强度运动会引起血清睾酮水平下降,甚至睾丸组织结构的病理性改变^[4-5];长时间中等强度运动后血清总睾酮水平和黄体生成素水平都上升,睾丸的形态结构也明显改善^[6]。人体实验也发现,经过10周的减肥训练营生活后,男性青少年的体重和体成分显著改善的同时,血清睾酮水平也显著提高^[7]。但是,运动对性激素代谢的影响机制尚不明确。

由于普遍缺乏必要的营养知识,我国少年儿童不合理的饮食习惯导致其高脂、高热量饮食摄入量,进而破坏了机体的能量平衡。众所周知,运动是增加能量消耗的有效手段,但适宜的运动是否可以

通过对P450 arom的作用,改善由高脂膳食诱发性激素比例失衡,尚不知晓。本研究旨在观察高脂膳食对大鼠性激素水平及P450 arom表达量的影响,探讨6周自由转轮运动的干预效果及可能机制,以期为指导少年儿童的合理饮食及科学运动奠定一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 实验对象与分组

40只初断乳清洁级雄性SD大鼠,购于北京维通利华实验动物有限公司(产品编号SCXK(京)2006-0009),体重为 (53.9 ± 2.9) g。适应性喂养2周后,随机分为4组($n=10$):普通膳食对照组(C组)、普通膳食运动组(E组)、高脂膳食组(D组)、高脂膳食运动组(ErD组)。C、E组普通膳食喂养,D和ErD组高脂膳食喂养。C和D组不进行运动,E、ErD组进行6周自由转轮运动。ErD组大鼠在6周运动过程中死亡1只,样本数变为9,其他各组大鼠无死亡情况出现。饲料配方见表1^[8]。

表1 普通饲料和高脂饲料配方 (g/1000g饲料)

成分	高脂膳食	基础饲料
玉米淀粉	237.485	407.485
酪蛋白	200	200
糊精	132	132
大豆油	30	30
猪油	150	30
蔗糖	150	100
纤维素	50	50
混合矿物质	35	35
混合维生素	10	10
L-胱氨酸	3	3
胆酸	2.5	2.5
丁基苯氧	0.015	0.015

1.2 运动方案

2周适应性喂养后,E和ErD组大鼠进行自由转轮运动。将大鼠放置于自制转轮(已获专利)中,转轮直径为30.6cm,周长约96cm。大鼠在转轮中自由运动,无人为驱赶,每天上、下午各1h(上午:9:00—11:00,下午:14:00—16:00),5d/w,总共6周。

1.3 取材

最后一次运动结束后,大鼠禁食24h,其间自由饮水。采用2%戊巴比妥钠麻醉大鼠,按0.5ml/200g体重的计量进行腹腔注射,腹主动脉取血,制备血清,转入-80℃超低温冰箱中保存备用。同时,心尖部灌流固定,依次注入0.75%生理盐水和4%多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1mol/L,PH=7.4),然后取睾丸、肝脏、股四头肌和肾脏,投入4%的中性多聚甲醛溶液(0.1mol/L,pH=7.4)固定24h。常规石蜡包埋用于免疫组化。

1.4 血清性激素的测定

采用化学发光免疫分析法测定大鼠血清睾酮、雌二醇含量。试剂盒由SIEMENS(西门子)公司提供,指标的测定均按照试剂盒说明书操作。睾酮的最低检出值为20ng/dl,雌二醇的最低检出值为20pg/ml。

1.5 睾丸、股四头肌、肝脏和肾脏中P450 arom表达量的测定

采用免疫组化SP二步法检测各组织中P450 arom蛋白表达量。脱蜡、复水;3% H_2O_2 孵育10min;微波炉抗原修复;10%BSA孵育40min;一抗4℃过夜,各组织一抗稀释浓度为:睾丸1:800、骨骼肌1:30、肝脏1:100、肾脏1:100;次日,滴加二抗(辣根过氧化物酶标记),37℃恒温箱孵育40min;DAB显色;苏木精复染2min,盐酸酒精分化30s,PBS返蓝(30s);梯度酒精复水,二甲苯透明;中性树胶封片;Nikon荧光显微镜下观察、拍照。阴性对照组免疫组化染色用PBS代替一抗,其他步骤相同。

以细胞间质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞,尼康显微镜拍摄系统进行拍照,每个样本选取20个高倍视野($\times 400$),用图像分析软件IPP6.0进行平均光密度(average optical density, AOD)的统计。

1.6 统计学分析

所有测试结果均采用均数 $\pm$ 标准差来表示,组

间数据比较采用SPSS 13.0软件Univariate法进行统计。

2 结果

2.1 各组大鼠血清性激素水平

与C组相比,D组大鼠血清睾酮水平出现明显的下降,检出率仅为50%,剩余大鼠的血清睾酮平均值为(54.26 $\pm$ 37.03)ng/dl,低于C组大鼠血清睾酮含量(103.36 $\pm$ 94.40)ng/dl。经过6周的自由转轮运动后,ErD组大鼠的血清睾酮水平仍处于较低水平,检出率为44.4%,剩余大鼠血清睾酮平均值为(78.50 $\pm$ 66.06)ng/dl,高于D组的(54.26 $\pm$ 37.03)ng/dl,但是两者之间没有显著性差异($P > 0.05$)。见表2。

与C组大鼠相比,D组大鼠雌二醇含量升高幅度较大,且具有非常显著性差异($P < 0.01$)。6周自由转轮运动后,ErD组大鼠雌二醇水平出现显著性下降($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血清性激素水平 ($\bar{x} \pm s$)

项目	C组(n=10)	E组(n=10)	D组(n=10)	ErD组(n=9)
总睾酮 检出率(%)	90	100	50	44.4
总睾酮 (ng/dl)	103.36 $\pm$ 94.40	78.51 $\pm$ 55.89	54.26 $\pm$ 37.03	78.50 $\pm$ 66.06
雌二醇 (pg/ml)	54.60 $\pm$ 19.41	41.66 $\pm$ 17.53	134.23 $\pm$ 48.35 ^①	82.35 $\pm$ 26.84 ^②

与C组相比:① $P < 0.01$;与D组相比:② $P < 0.05$

注:C组有一个样本未检出($< 20pg/ml$),D组5个样本未检出,ErD组5个样本未检出;检出率为睾酮水平 $> 20ng/dl$ 的样本数占本组总样本数的比例。

2.2 芳香化酶在大鼠睾丸、股四头肌、肝脏和肾脏中的免疫定位

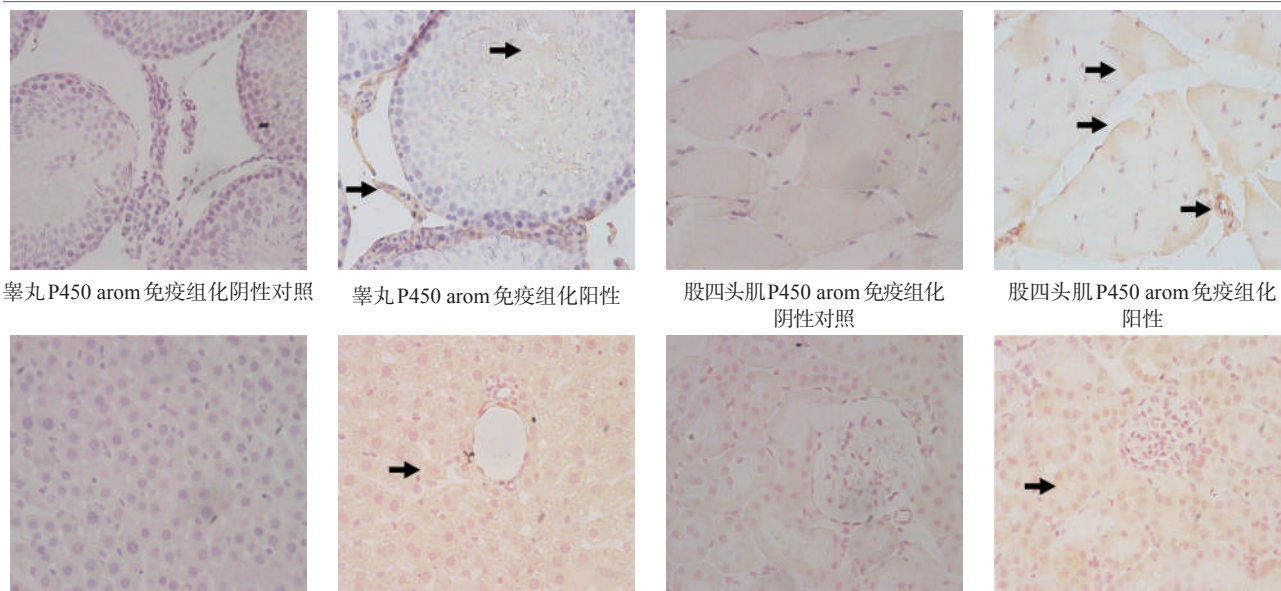
睾丸、股四头肌、肝脏和肾脏中存在P450 arom的表达。睾丸中P450 arom主要在睾丸间质细胞中表达,曲细精管、各级精母细胞都有表达。股四头肌中P450 arom以块状分布,而且在血管中也出现P450 arom的表达。由于肝脏是实质性器官,其细胞质中发现P450 arom的表达。肾脏细胞中P450 arom主要在肾小管中表达。见图1。

2.3 高脂膳食和自由转轮运动对睾丸、股四头肌、肝脏和肾脏中P450 arom表达量的影响

高脂膳食饲养后,D组大鼠睾丸中P450 arom表达量显著高于C组($P < 0.05$)。6周的自由转轮运动

图1 P450 arom免疫定位

(免疫组化染色, ×400)



睾丸P450 arom免疫组化阴性对照 睾丸P450 arom免疫组化阳性 股四头肌P450 arom免疫组化阴性对照 股四头肌P450 arom免疫组化阳性
肝脏P450 arom免疫组化阴性对照 肝脏P450 arom免疫组化阳性 肾脏P450 arom免疫组化阴性对照 肾脏P450 arom免疫组化阳性
注:大鼠不同组织芳香化酶阴性和阳性结果,箭头所指为阳性细胞区域。此结果来源于普通膳食对照组(C组)大鼠。

后,ErD组大鼠睾丸中P450 arom表达量显著低于D组($P < 0.05$)。见表3、图2。与C组相比,D组大鼠股四头肌中P450 arom表达量显著增高($P < 0.05$)。与D组相比,ErD组大鼠P450 arom表达量由 0.0214 ± 0.0018 降为 0.0179 ± 0.0058 ,但是没有显著性差异。见表3、图3。

表3 各组大鼠睾丸、股四头肌、肝脏和肾脏中P450 arom表达量 ($\bar{x} \pm s$)

部位	C组(n=10)	E组(n=10)	D组(n=10)	ErD组(n=9)
睾丸	0.0049 ± 0.0010	0.0049 ± 0.0005	0.0075 ± 0.0033^{①}	0.0010 ± 0.0007^{②}
股四头肌	0.0040 ± 0.0013	0.0069 ± 0.0048^{①}	0.0106 ± 0.0080^{①}	0.0083 ± 0.0047
肝脏	0.0146 ± 0.0016	0.0165 ± 0.0028	0.0205 ± 0.0030^{②}	0.0201 ± 0.0067
肾脏	0.0088 ± 0.0014	0.0096 ± 0.0009	0.0143 ± 0.0039^{②}	0.0092 ± 0.0005^{③}

与C组相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;与D组相比:③ $P < 0.05$;④ $P < 0.01$

D组大鼠肝脏中的P450 arom表达量非常显著高于C组($P < 0.01$)。与D组相比,ErD组P450 arom表达量出现下降,但是两者之间没有差异。见表3、图4。高脂膳食明显增加了大鼠肾脏P450 arom的表达量,差异具有显著性意义($P < 0.05$),而6周自由转轮运动可以显著降低高脂膳食引起的P450 arom增多现象($P < 0.05$)。见表3、图5。

3 讨论

3.1 有氧运动对高脂膳食大鼠血清性激素的影响

前人研究证明无论是儿童、青年人、中年人还是老年人,高脂饮食均可以影响性激素的水平。横断面和前瞻性研究表明:男性出现低雄激素现象与能量过剩显著相关^[9]。宋霞^[10]发现能量过剩男性青少年血清雌二醇升高,睾酮分泌下降,存在性激素代谢紊乱现象。本实验结果显示,高脂膳食导致大鼠血清雌二醇水平显著升高,血清睾酮水平出现严重不足,提示高脂膳食喂养使大鼠体内性激素出现严重紊乱,其机制还有待于进一步探讨。

运动训练则可以改善受年龄、高脂饮食等因素影响的机体内雌雄激素水平异常的现象。长期从事游泳训练的老年人可以延缓年龄增长带来的总血睾酮降低^[11]。动物实验表明,运动训练改善能量过剩诱导的性激素紊乱,其机制可能是中等强度运动使高脂膳食大鼠机体内分泌出现良好的适应,黄体生成素增加,促进睾酮的合成,睾丸组织结构的改善进一步增加睾酮的分泌^[6]。Birkebaek等^[7]研究发现经过10周的减肥训练营生活后,男性青少年的身体质量指数降低,同时胰岛素的敏感性、性激素球蛋白和睾酮水平增高。

图2 各组大鼠睾丸中P450 arom表达量

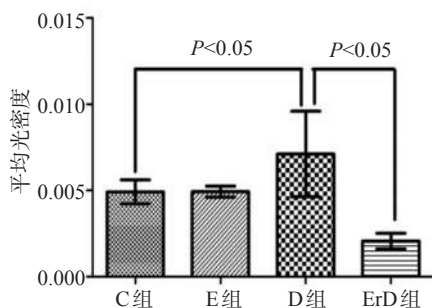


图4 各组大鼠肝脏中P450 arom表达量

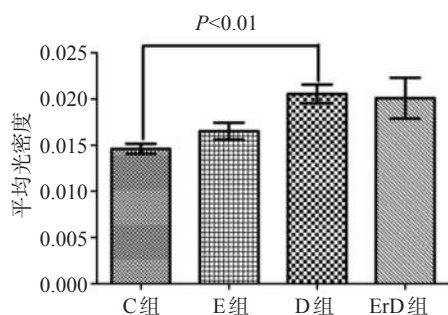


图3 各组大鼠股四头肌中P450 arom表达量

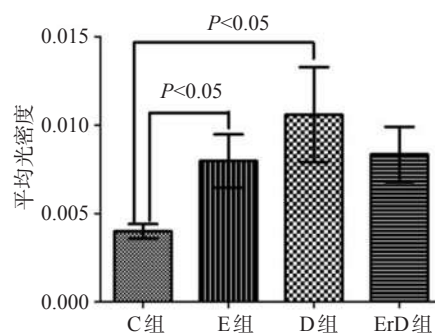
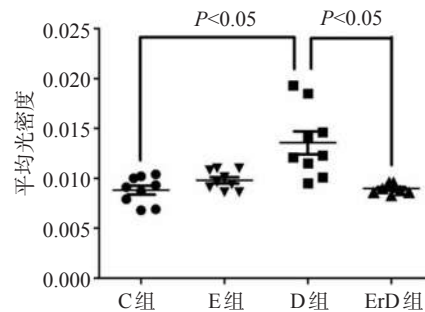


图5 各组大鼠肾脏中P450 arom表达量



本研究发现经过6周的自由转轮运动后,与高脂膳食对照组相比,高脂膳食运动组大鼠雌二醇水平显著性降低。其结果与上述报道一致,自由转轮运动作为中低等强度运动在改善高脂膳食诱导的雌二醇升高方面起到一定的作用。另外,高脂膳食对照组大鼠血清总睾酮水平很低,6周的自由转轮运动后总睾酮水平仍然很低,但检出值的平均值比高脂膳食对照组较高,但是没有显著性差异,这一点的结果不是很理想。其原因可能是本实验采用的自由转轮运动属于中低强度水平。有研究发现,作为有效降低脂肪的运动手段,4周自由转轮运动(8.8—9.3km/d)能够显著降低高脂饲养大鼠皮下和内脏脂肪含量^[12]。同时Roberts等^[13]培育出高自由转轮活动水平和低自由转轮活动水平小鼠,分别为9.3km/d和1.1km/d。Hyatt等^[14]采用低水平自由转轮运动能够显著增加骨骼肌氧化能力。而本研究普通膳食运动组和高脂膳食运动组大鼠自由转轮距离分别为566—733m/d和478—647m/d,远小于1.1km/d。因此本研究采用的自由转轮运动处于低水平。但是总

体来说,作为真实反映大鼠运动习性的转轮运动,它对于改善高脂膳食诱导的大鼠性激素出现紊乱具有一定作用。

3.2 有氧运动对高脂膳食大鼠各脏器中P450 arom表达量的影响

研究证明,许多性腺外组织不仅是雌激素的靶器官,而且具有把雄激素转化为雌激素的能力。近年来在睾丸、卵巢、肝脏、肾脏和大脑均发现了P450 arom RNA和蛋白,但是肝脏、肾脏中P450 arom mRNA的总量较卵巢、睾丸和大脑低,免疫组织化学技术发现芳香化酶在肌肉中合成,而且定位于细胞质和胞质膜上^[15]。本研究发现:P450 arom在睾丸、骨骼肌细胞、肝细胞和肾细胞的细胞膜上出现阳性细胞。这些结果与以往的研究相似。提示芳香化酶作为调节性激素比例的一个重要酶广泛存在于脏器内。

P450 arom作为雄激素合成雌激素过程中的关键酶,它的表达量影响雄激素的代谢及雌激素的生成,在调节脊椎类动物雌雄激素之间平衡方面起着

重要的作用^[16]。对于男性来说,睾丸提供15%循环系统中的雌激素水平,剩余85%是由外周组织中(脂肪组织、大脑、骨和内皮等)雄激素经过芳香化作用而来^[17]。目前关于能量过剩对P450 arom表达量影响的研究多集中于脂肪组织中P450 arom变化。近年研究发现,脂肪细胞和巨噬细胞之间存在的能量过剩影响P450 arom的可能机制是:能量过剩-炎症-芳香轴:能量过剩个体,脂质分解作用增强,饱和脂肪酸刺激巨噬细胞炎症因子的产生,进而促进脂肪细胞中P450 arom mRNA和蛋白的表达^[18]。Ayanian等^[19]研究表明:能量过剩男性由于体内脂肪组织中P450 arom表达增加,从而将雄激素转化为雌激素量增多,导致雄激素/雌激素比例失衡。但是关于高脂膳食对外周组织如骨骼肌、肝脏和肾脏中P450 arom表达量影响的研究较少。本研究证明高脂膳食导致睾丸、肝脏、骨骼肌和肾脏中P450 arom表达量增加。研究采用免疫组织化学方法定点定量检测骨骼肌细胞、肝脏细胞和肾脏细胞中P450arpm表达量,而对其他组织(如高脂膳食造成脂质异位沉积)不进行统计,因此排除骨骼肌、肝脏和肾脏中异位沉淀脂肪组织对结果的干扰作用。这一结果提示,基于P450 arom广泛存在于性腺和性腺外组织中的事实,能量过剩不仅增加脂肪组织芳香化作用,也会增加其他脏器中P450 arom的蛋白表达量。

基于上述高脂膳食增加P450 arom表达量的原因,运动对P450 arom蛋白表达量的影响可能是减少了细胞内质网的应激和氧化应激。能量过剩儿童体力活动增加之后其血清C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度降低,胰岛素敏感性和内皮功能增加^[20]。6周力量训练改善了老年人运动后的脂质过氧化水平^[21]。本研究发现长时间自由转轮运动减弱了高脂膳食诱发的性腺和性腺外组织中P450 arom表达增加的程度,这可能与运动训练降低氧化应激状态、增加腺苷酸环化酶(Adenylyl cyclase, cAMP)信号活性和黄体生成素有关^[22],因为在机体内P450 arom表达受cAMP、胰岛素和黄体生成素等化学物质和激素调控^[23]。但是有关长时间有氧运动对P450 arom表达影响的机制还有待于进一步研究。

综上所述,高脂膳食可引起雄性大鼠睾酮水平

降低和雌二醇水平增高。6周自由转轮运动一定程度上改善了由高脂膳食引起的性激素水平异常现象,其作用可能与降低了睾丸及性腺外组织的芳香化酶的表达有关。

参考文献

- [1] 李翠珍,赵刚.耐力训练对雄性高脂膳食大鼠血清瘦素水平及性发育的影响[J].沈阳师范大学学报(自然科学版),2009,27(01):105—109.
- [2] 解轶男.男子肥胖儿少雌激素与雄激素比值变化初探[D].北京体育大学,2010.
- [3] Ueyama T, Shirasawa N, Numazawa M, et al. Gastric parietal cells: potent endocrine role in secreting estrogen as a possible regulator of gastro-hepatic axis[J]. Endocrinology, 2002, 143(8):3162—3170.
- [4] 严翊,谢敏豪.运动性血睾酮降低过程中大鼠组织形态变化的观察[J].北京体育大学学报,2008,(02):187—189.
- [5] 严翊,谢敏豪,李晟玮.大鼠五周间歇性无氧游泳训练的血睾酮降低模型[J].北京体育大学学报,2009,(02):63—66.
- [6] 曾庆敏.运动对食源性肥胖的雄性SD大鼠性激素水平的影响[D].武汉体育学院,2009.
- [7] Birkebaek NH, Lange A, Holland-Fischer P, et al. Effect of weight reduction on insulin sensitivity, sex hormone-binding globulin, sex hormones and gonadotrophins in obese children[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 163(6):895—900.
- [8] 那立欣,赵丹,宁华,等.减肥功能实验动物模型的改良[J].卫生研究,2010,(02):162—164.
- [9] Abate N, Haffner SM, Garg A, et al. Sex steroid hormones, upper body obesity, and insulin resistance[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(10):4522—4527.
- [10] 宋霞.男性青少年肥胖患者血清瘦素与性激素、生长激素的含量水平变化分析[J].中国卫生检验杂志,2010,20(11):2976—2977.
- [11] 戴继灿,向祖琼,黄翼然,等.长期锻炼对老年男性瘦素、性激素及其结合蛋白水平的影响及意义[J].中国男科学杂志,2005,19(04):25—27.
- [12] Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(2):E495—E504.
- [13] Roberts MD, Brown JD, Company JM, et al. Phenotypic and molecular differences between rats selectively bred to voluntarily run high vs. low nightly distances[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013, 304(11):R1024—R1035.
- [14] Hyatt HW, Toedebusch RG, Rueggsegger G, et al. Comparative adaptations in oxidative and glycolytic muscle fibers in a low voluntary wheel running rat model performing three levels of physical activity[J]. Physiol Rep, 2015, 3(11): pii: e12619.
- [15] Castagnetta LA, Agostara B, Montalto G, et al. Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(16):5041—5045.

(下转第685页)