

减味寿胎丸介导妊娠特异性糖蛋白1治疗自然流产的机制

周月希^{1,2}, 杜鑫^{1,3}, 吕孝丽¹, 余庆英¹, 张慧敏¹, 郜洁⁴, 罗颂平⁴

(¹广州中医药大学, 广州 510405; ²武汉市第一医院, 武汉 430022; ³青岛大学附属妇女儿童医院, 青岛 266034; ⁴广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

摘要: 目的: 探讨减味寿胎丸治疗自然流产(SA)的作用机制。方法: 收集SA及人工流产者的绒毛组织, Western Blot验证妊娠特异性糖蛋白1(PSG1)蛋白的表达。细胞实验选择HTR-8/SVneo滋养细胞, CCK-8检测不同浓度的减味寿胎丸对细胞的毒性。根据临床绒毛组织验证结果构建滋养细胞SA疾病细胞模型, 设置对照组、模型组、减味寿胎丸低剂量组(50 μ g/mL)、减味寿胎丸中剂量组(100 μ g/mL)、减味寿胎丸高剂量组(200 μ g/mL), 划痕实验检测各组滋养细胞的迁移能力, transwell实验检测各组滋养细胞的侵袭能力。根据上述实验结果选出减味寿胎丸最佳作用浓度, Western Blot检测对照组、模型组、减味寿胎丸组PSG1、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、肿瘤坏死因子受体相关蛋白1(TRAP1)、Smad4蛋白的表达。结果: PSG1在SA绒毛组织中的表达低于人工流产者。50 μ g/mL和100 μ g/mL减味寿胎丸促进细胞增殖($P < 0.01$), 而200 μ g/mL显示出一定的毒性($P < 0.01$)。低、中剂量减味寿胎丸细胞的迁移和侵袭能力较模型组改善, 其中100 μ g/mL减味寿胎丸改善作用更为明显, 而200 μ g/mL减味寿胎丸未能明显改善模型细胞的迁移能力。100 μ g/mL减味寿胎丸可显著提高模型细胞PSG1、TGF- β 1、TRAP1和Smad4蛋白的表达($P < 0.01$)。结论: 减味寿胎丸可以提高PSG1表达并上调TGF- β /Smad通路蛋白表达, 提高滋养细胞的侵袭及迁移能力, 发挥抵抗SA的作用。

关键词: 减味寿胎丸; 自然流产; 滋养细胞; 妊娠特异性糖蛋白1; TGF- β /Smad通路; 机制

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81574011, No.82205170), 广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队(No.2021XK04), 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)(No.国中医人教发[2018]12号), 广东省重点领域研发计划项(No.2020B1111100003), 武汉市科技局知识创新专项曙光计划(No.2022020801020529)

Mechanism of PSG1 mediated by Jianwei Shoutai Pill in the treatment of spontaneous abortion

ZHOU Yue-xi^{1,2}, DU Xin^{1,3}, LYU Xiao-li¹, YU Qing-ying¹, ZHANG Hui-min¹, GAO Jie⁴, LUO Song-ping⁴

(¹Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; ²Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, China; ³Women and Children's Hospital, Qingdao University, Qingdao 266034, China; ⁴The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective: To explore the mechanism of Jianwei Shoutai Pill in the treatment of spontaneous abortion (SA). Methods: The villi of SA and induced abortion were collected, and the expression of PSG1 protein was verified by Western Blot. HTR-8/SVneo trophoblast cells were selected for cell experiment, and CCK-8 was used to detect the cytotoxicity of different concentrations of Jianwei Shoutai Pill. The control group, model group, low-dose Jianwei Shoutai Pill group (50 μ g/mL), medium dose Jianwei Shoutai Pill group (100 μ g/mL) and high-dose Jianwei Shoutai Pill group (200 μ g/mL) were set up. The migration ability of trophoblast was detected by scratch test, and the invasion ability of trophoblast was detected by transwell test. According to the above experimental results, the optimal concentration of Jianwei Shoutai Pill was selected. Western Blot was used to detect

PSG1, TGF- β 1, TRAP1 and Smad4 proteins in control group, model group and Jianwei Shoutai Pill group. Results: The expression of PSG1 in villi of SA was lower than that of normal pregnancy. Jianwei Shoutai Pill at the concentration of 50 μ g/mL and 100 μ g/mL promoted cell proliferation ($P < 0.01$), while the concentration of 200 μ g/mL showed certain toxicity ($P < 0.01$). Compared with model group, the migration and invasion ability of siPSG1 model cells were improved by low-, medium-dose Jianwei Shoutai Pills group. The improvement effect of 100 μ g/mL Jianwei Shoutai Pill was more obvious, while 200 μ g/mL Jianwei Shoutai Pill could not significantly improve the migration ability of model cells. Jianwei Shoutai Pill (100 μ g/mL) could improve the expression of PSG1, TGF- β 1, TRAP1 and Smad4 in model cells ($P < 0.01$). Conclusion: Jianwei Shoutai Pill can increase the expression of PSG1, up regulate TGF- β /Smad pathway, improve the invasion and migration of trophoblast and play a role in resisting SA.

Key words: Jianwei Shoutai Pill; Spontaneous abortion (SA); Trophoblast; Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1); TGF- β /Smad pathway; Mechanism

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81574011, No.82205170), 'Double First-class' and High-level University Discipline Collaborative Innovation Team of Guangzhou University of Chinese Medicine (No.2021XK04), Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation 'Hundred-Thousand-Ten Thousand' Talent Project (Qihuang Project) (No. [2018] 12), Key R&D Programme of Guangdong Province (No.2020B1111100003), Dawn Plan for Knowledge Innovation of Wuhan Science and Technology Board (No.2022020801020529)

自然流产 (spontaneous abortion, SA) 定义为发生在妊娠28周以前的胚胎自然丢失、无法持续的宫内妊娠, 多数自然流产均发生在妊娠12周以内。随着经济社会的发展加快, 妇女工作压力增大、生育期推迟、环境污染等问题, SA的发生率有逐年攀升的趋势。SA的致病因素复杂, 探索SA的发病机制, 健全该类疾病的治疗手段对于指导临床妊娠、防治SA具有重要意义。减味寿胎丸是罗颂平教授治疗SA的常用基础方, 用于治疗SA常有验效。为了明确减味寿胎丸治疗SA的药效机制, 本研究进行了如下探索。

材料与方

1. 临床标本收集 本研究所用绒毛组织均来自广州中医药大学第一附属医院日间手术室, 所有收集组织留存在标本库中, 标本收集经广州中医药大学第一附属医院伦理委员会批准 (批号: 科YJ[2015]021号)。所有纳入者均签署知情同意书, 人流或清宫术后无菌条件下留取绒毛组织。

2. 纳入标准 ①正常早孕人工流产者 (N组): 年龄18~35岁, 临床孕周6~9周, B超见孕囊、卵黄囊及心管搏动, 主动要求终止妊娠行人工流产者; ②SA清宫术患者 (SA组): 年龄18~35岁, 临床孕周6~9周, B超见胚胎停育或未见胎心, 与停经天数明显不相符, 明确SA诊断需要行清宫术者。

3. 排除标准 ①夫妻双方或一方染色体异常者; ②重要器官严重病变、精神疾病及感染性疾病者; ③孕期服用有潜在及明确有胚胎毒性药物者; ④病史资料不完整者。

4. 减味寿胎丸母液制备 菟丝子 (广东天诚中药饮片有限公司, 批号: 160601)、桑寄生 (广东天诚中药饮片有限公司, 批号: 150701)、川续断 (康美药业股份有限公司, 批号: 170200231), 减味寿胎丸冻干粉制备: 将菟丝子、桑寄生、川续断按照20:10:10比例混合, 使用中药粉碎机粉碎成20目粗粉混合物, 加入10倍纯水浸泡, 经加热、沸腾、回流煎煮、过滤

后, 回旋蒸发浓缩至黏稠糊状, 干燥成粉状, 4 $^{\circ}$ C保存备用。称取0.1 g减味寿胎丸冻干粉, 加入1 mL DMSO溶液, 充分溶解后, 药液经0.4 μ m微孔滤膜过滤, 得到100 mg/mL的减味寿胎丸母液。

5. 细胞株、试剂与仪器 HTR-8/SVneo滋养细胞株 (ATCC细胞库)。CCK-8试剂盒 (日本同仁, 批号: CK04), Matrigel基质胶 (康宁, 批号: 356234), 妊娠特异性糖蛋白1 (pregnancy-specific glycoprotein 1, PSG1) 抗体 (abcam, 批号: ab233130), 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 抗体 (abcam, 批号: ab215715), 肿瘤坏死因子受体相关蛋白1 (tumor necrosis factor receptor-associated protein 1, TRAP1) 抗体 (Proteintech, 批号: 10325-1-AP), Smad4抗体 (abcam, 批号: ab40759), 一抗稀释液 (碧云天, 批号: P0256), 山羊抗兔抗体 (四正柏生物, 批号: GMG5RG10-0482), RIPA裂解液 (碧云天, 批号: P0013B), SDS-PAGE蛋白上样缓冲液 (碧云天, 批号: P0015), SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒 (碧云天, 批号: P0012AC), BCA蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 批号: P0010S)。

Multiskan FC型酶标仪 (Thermo Fisher Scientific), PowerPacTM型电泳仪 (Bio-rad), IX71型显微镜 (OLYMPUS), ChemiDocTMMP型ChemiDoc成像仪 (Bio-rad)。

6. 干预方法 收集SA及人工流产者的绒毛组织, Western Blot验证PSG1蛋白的表达。细胞实验选择HTR-8/SVneo滋养细胞, CCK-8检测不同浓度的减味寿胎丸对细胞的毒性。根据临床绒毛组织验证结果构建滋养细胞SA疾病细胞模型, 设置对照组、模型组、减味寿胎丸低剂量组 (50 μ g/mL减味寿胎丸)、减味寿胎丸中剂量组 (100 μ g/mL减味寿胎丸)、减味寿胎丸高剂量组 (200 μ g/mL减味寿胎丸), 划痕实验检测各组滋养细胞的迁移能力, Transwell实验检测各组滋养细胞的侵袭能力。

根据上述实验结果选出减味寿胎丸最佳作用浓度, Western Blot 检测对照组、模型组、减味寿胎丸组PSG1、TGF-β1、TRAP1、Smad4蛋白的表达。

7. 观察指标

7.1 Western Blot检测绒毛组织PSG1蛋白变化 RIPA裂解液提取绒毛组织蛋白溶液, BCA法测定蛋白浓度, 加入RIPA裂解液和溴酚蓝使所有样品蛋白为同一浓度, 100 °C蛋白变性5 min。配制电泳凝胶, 加入蛋白样品后70 V、30 min+120 V、1 h条件下电泳。将凝胶与PVDF膜贴合, 300 mA、1~2 h条件下冰浴转膜。取出PVDF膜后, 5%脱脂牛奶封闭2 h。加入PSG1一抗, 4 °C过夜孵育。加入二抗, 室温孵育1 h。避光显影, 获得灰度条带, 计算灰度值。

7.2 CCK-8检测减味寿胎丸对HTR-8/SVneo滋养细胞的毒性 培养细胞至融合面积约50%时, 加入不同浓度的减味寿胎丸, 即50、100、200 μg/mL共作用48 h。弃掉培养基, 每孔加入10 L CCK-8和90 L全培, 培养箱中孵育2 h, 酶标仪检测。

7.3 划痕实验检测细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后的迁移力变化 细胞接种至6孔板, 融合面积达到50%以上时开始转染。对照组: A管: opti-MEM培养基+siNC; B管: opti-MEM培养基+转染试剂。模型组: A管: opti-MEM培养基+siPSG1; B管: 同对照组。3个加药组转染方式同模型组。各组的A管与B管混合孵育后加入细胞培养基中。3个加药组在转染6 h后加入相应终浓度(50、100、200 μg/mL)的减味寿胎丸溶液。培养细胞至融合面积为80%, 移液枪枪头垂直6孔板底部划痕, PBS清洗3遍, 洗去悬浮细胞。取0、24、48 h 3个时间点观察划痕处细胞迁移情况。

7.4 Transwell实验检测细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后的侵袭力变化 用培养基将提前4 °C解冻的Matrigel基质胶稀释, 80 μL/室包被小室的上室面, 培养箱内过夜使基质胶成凝胶状。水化基质胶, 制备细胞悬液, 1.0×10⁴/室种在基质胶上。下室内加10%FBS, 避免产生气泡。培养箱培养24 h。取出Transwell小室, PBS清洗, 4%多聚甲醛固定, 加0.1%结晶紫染色, 显微镜下随机取5个视野观察细胞, 计算穿过基质胶的细胞数量。

7.5 Western Blot检测细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后的PSG1、TGF-β1、TRAP1、Smad4蛋白的表达 检测方式同“7.1”项。

8. 统计学方法 采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8软件对数据进行统计分析。所有计量资料用Shapiro-Wilk法进行正态性检验, 满足正态分布, 统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。3组及以上多组比较, 正态分布资料用单因素方差分析, 事后多重比较, 方差齐用Tukey法, 方差不齐用Dunnett's T3法。以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1. N组和SA组绒毛组织中PSG1蛋白表达情况 见图1。SA组PSG1蛋白表达较N组显著降低(P<0.01)。

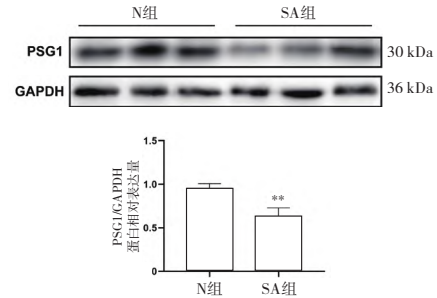


图1 两组患者绒毛组织PSG1蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=3$)
注: 与N组比较, **P<0.01。

2. 减味寿胎丸对HTR-8/SVneo滋养细胞的毒性 见图2。与0 μg/mL(对照组)比较, 50 μg/mL和100 μg/mL浓度促进细胞增殖(P<0.01), 而200 μg/mL浓度显示出一定的毒性, OD值显著低于0 μg/mL的对照组(P<0.01)。

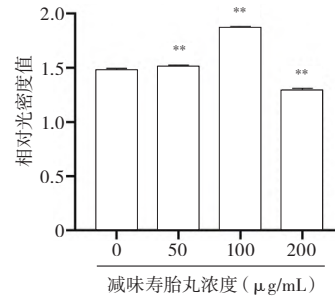


图2 CCK-8检测不同浓度减味寿胎丸作用48 h后HTR-8/SVneo的OD值($\bar{x} \pm s, n=3$)
注: 与0 μg/mL比较, **P<0.01。

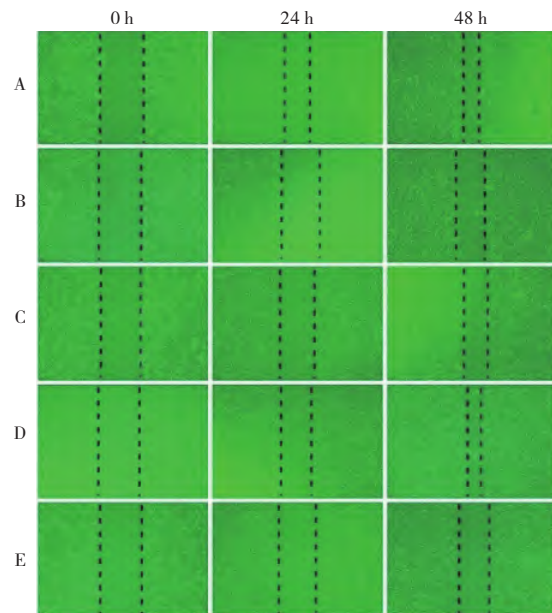


图3 减味寿胎丸干预siPSG1模型细胞后不同时间点迁移能力的变化情况(×40)
注: A. 对照组; B. 模型组; C. 减味寿胎丸低剂量组; D. 减味寿胎丸中剂量组; E. 减味寿胎丸高剂量组。图4同。

3. 细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后的迁移力变化 见图3。减味寿胎丸低、中剂量组细胞迁移速度较模型组明显加快,其中,减味寿胎丸中剂量组改善作用更为明显。而减味寿胎丸高剂量组未能明显改善siPSG1模型细胞的迁移能力。

4. 细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后的侵袭力变化 见图4。与对照组比较,模型组细胞穿透基质胶个数显著减少

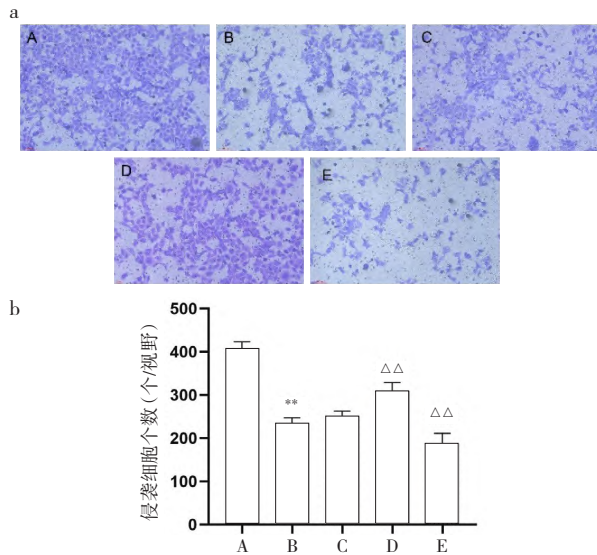


图4 减味寿胎丸干预siPSG1模型细胞后侵袭能力的变化情况
注: a. 各组细胞侵袭情况($\times 100$); b. 各组侵袭细胞个数比较($\bar{x} \pm s, n=3$)。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

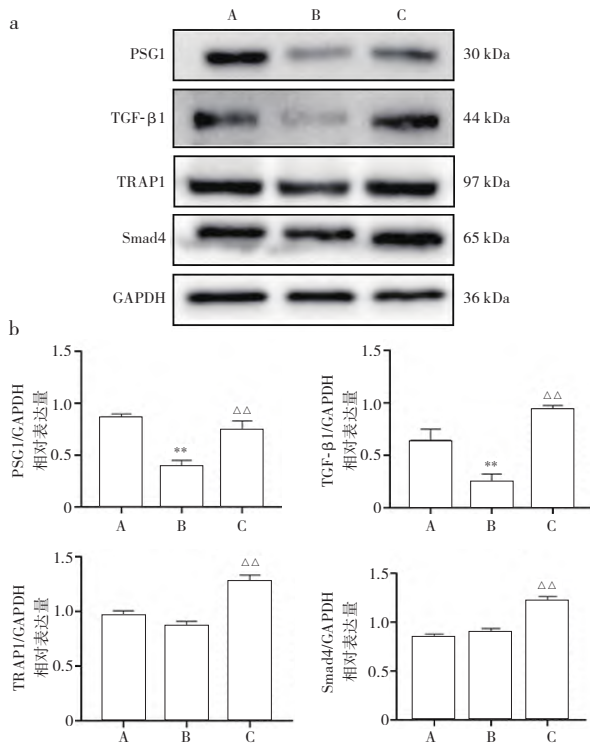


图5 减味寿胎丸干预siPSG1模型细胞后PSG1、TGF-β1、TRAP1、Smad4蛋白表达情况

注: A. 对照组; B. 模型组; C. 减味寿胎丸组。a. 各组蛋白表达条带; b. 各组蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)。与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

($P<0.01$)。减味寿胎丸中剂量组细胞穿透基质胶的个数显著多于模型组($P<0.01$),而减味寿胎丸高剂量组穿透细胞个数显著少于模型组($P<0.01$)。

5. 细胞转染siPSG1及加入减味寿胎丸后PSG1、TGF-β1、TRAP1、Smad4蛋白表达情况 见图5。经减味寿胎丸作用siPSG1模型细胞划痕实验和Transwell实验,加入减味寿胎丸100 μg/mL是最佳作用浓度。取该浓度作用细胞,检测PSG1、TGF-β1、TRAP1和Smad4蛋白的差异。结果发现,与对照组比较,模型组PSG1、TGF-β1蛋白表达显著降低($P<0.01$);与模型组比较,减味寿胎丸组可显著提高PSG1、TGF-β1、TRAP1、Smad4蛋白的表达($P<0.01$)。

讨论

母胎界面是母体和胎儿组织之间接触的解剖部位,包括壁蜕膜、底蜕膜、绒毛或滋养层,该结构主要由滋养层细胞、蜕膜细胞及免疫细胞构成^[1-2]。在胚胎植入过程中,母胎界面的绒毛外滋养细胞迁移并侵袭到子宫内膜,重塑子宫动脉以进行血液和营养物质交换,绒毛外滋养层细胞(extravillous trophoblast, EVT)成功侵袭进入母体蜕膜是建立和维持妊娠的先决条件,而EVT细胞浸润的紊乱将会导致SA的发生。

PSG1在人类胎盘中表达丰富,不仅可以通过与细胞表面蛋白聚糖相互作用,诱导血管内皮生长因子A分泌促进内皮细胞小管形成^[3];还可以影响白细胞介素(interleukin, IL)-10、IL-6等因子的分泌调节母体免疫应答^[4]。但PSG1是否调控EVT细胞的迁移及侵袭到母体蜕膜笔者还未见相关文献报道。

寿胎丸是临床常用的经典安胎方剂,记载于《医学衷中参西录》,是清代名医张锡纯所创制的治疗SA的经验方。郜洁^[5]将寿胎丸原方进行均匀设计,优化处方,对寿胎丸的配伍规律及药效物质深入研究,在寿胎丸的基础去掉了补肾安胎作用不显著的使药阿胶,使菟丝子、桑寄生、续断的含量比例为20:10:10,即减味寿胎丸。全方补肾固冲安胎,适用于肾虚滑胎及妊娠下血、胎动不安、胎萎不长者。罗颂平教授常将此方作为临床辨证的基础方随证加减,收效甚佳。前期研究^[6]发现,减味寿胎丸具有雌激素样作用,可上调血清雌二醇水平和下丘脑-垂体-卵巢-子宫的雌激素受体,使Th17优势向Treg转移促进母胎免疫耐受状态的维持^[7],并提升蜕膜组织FOXO3和PR的表达,改善胎盘状态,降低SA的发生率^[8]。减味寿胎丸有多个有效活性成分,可发挥多靶点作用,参与胎盘形成、滋养细胞生长增殖、介导母胎界面血管形成、维持母体免疫耐受等多个妊娠过程。

本研究发现, PSG1在SA绒毛组织中的含量降低,可能是影响SA发生的基因之一,故通过干扰RNA沉默PSG1,观察基因沉默对滋养细胞功能的影响。PSG1的沉默可以使滋养细胞的迁移、侵袭能力得到抑制。在加入适当浓度的减味寿胎丸后,滋养细胞的迁移、侵袭能力得到恢复。那PSG1是如何调控滋养细胞侵袭迁移的呢?

文献研究发现, PSG1可以直接与TGF- β 1结合发挥生物学效应^[9]。TGF- β 1在妊娠中的重要性已被许多研究者所认识, 因为这种细胞因子参与了成功妊娠所必需的一些过程。在母胎界面, 蜕膜细胞产生的RANKL可以促进蜕膜 $\gamma\delta$ T细胞向Foxp3⁺调节性 $\gamma\delta$ T细胞的极化, 并通过激活NF- κ B途径提高TGF- β 1的产生^[10]。TGF- β 1可以反过来诱导Foxp3⁺调节性T细胞的极化^[11], 并保护它们免于凋亡^[12], 从而形成积极的反馈来抑制抗胎儿反应。在胚胎植入窗口期间, 胚胎的反复植入失败与子宫内膜中血小板和内皮细胞黏附分子1的表达降低以及TGF- β 1的减少有关^[13]。TGF- β 1可诱导HTR-8/SVneo细胞增殖和侵袭, 并通过激活Smad信号通路抑制细胞凋亡^[14]。

基于上述理论, 本研究对PSG1调控滋养细胞的侵袭迁移机制提出设想, PSG1是通过介导TGF- β /Smad通路调控滋养细胞侵袭迁移功能的。在细胞敲低PSG1后, TGF- β /Smad通路的关键蛋白——TGF- β 1、TRAP1的蛋白表达量较对照组降低, 说明PSG1降低引起TGF- β /Smad通路关键蛋白的下调可能是使滋养细胞侵袭迁移能力下降的机制。用siPSG1瞬转HTR-8/SVneo模拟SA疾病, 加入不同浓度的减味寿胎丸后, 细胞的迁移速度、穿透基质胶的个数较模型组明显加快, 其中100 g/mL减味寿胎丸改善作用更为明显。而200 μ g/mL减味寿胎丸未能明显改善siPSG1模型细胞的迁移和侵袭能力。说明一定浓度的补肾安胎复方减味寿胎丸可以发挥提高PSG1的功效, 介导PSG1表达并上调TGF- β /Smad通路影响滋养细胞的侵袭迁移, 发挥抗SA发生的作用。

参 考 文 献

- [1] Xu Y, Plazyo O, Romero R, et al. Isolation of leukocytes from the human maternal-fetal interface. *J Vis Exp*, 2015(99):e52863
- [2] 孟楠, 张思亚, 黄琳, 等. 母胎界面微环境改变与早产. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(2):135-140
- [3] Lisboa F A, Warren J, Sulkowski G, et al. Pregnancy-specific glycoprotein 1 induces endothelial tubulogenesis through interaction with cell surface proteoglycans. *J Biol Chem*, 2011, 286(9):7577-7586
- [4] Ha C T, Waterhouse R, Wessells J, et al. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *J Leukoc Biol*, 2005, 77(6):948-957
- [5] 邵洁. 寿胎丸的药物组成及其补肾安胎的药效学研究. 广州: 广州中医药大学, 2009
- [6] 李亚迪. 基于大鼠POI模型对减味寿胎丸雌激素样作用的研究. 广州: 广州中医药大学, 2016
- [7] 郝晓丽. 减味寿胎丸对SA病证结合模型小鼠安胎机理的研究. 广州: 广州中医药大学, 2016
- [8] 周月希, 余庆英, 罗颂平, 等. 减味寿胎丸对自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织中FOXO3及PR蛋白表达的影响. *中医杂志*, 2021, 62(4):335-340
- [9] Warren J, Im M, Ballesteros A, et al. Activation of latent transforming growth factor- β 1, a conserved function for pregnancy-specific beta 1-glycoproteins. *Mol Hum Reprod*, 2018, 24(12):602-612
- [10] Chang R Q, Shao J, Meng Y H, et al. Decidual RANKL/RANK interaction promotes the residence and polarization of TGF- β 1-producing regulatory $\gamma\delta$ T cells. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2):113
- [11] Du M R, Guo P F, Piao H L, et al. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J Immunol*, 2014, 192(4):1502-1511
- [12] Ouyang W, Beckett O, Ma Q, et al. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, 2010, 32(5):642-653
- [13] Guo F, Si C, Zhou M, et al. Decreased PECAM1-mediated TGF- β 1 expression in the mid-secretory endometrium in women with recurrent implantation failure. *Hum Reprod*, 2018, 33(5):832-843
- [14] Cui H, Li Q L, Chen J, et al. Hepatitis B virus X protein modifies invasion, proliferation and the inflammatory response in an HTR-8/SVneo cell model. *Oncol Rep*, 2015, 34(4):2090-2098

(收稿日期: 2021年12月11日)