

酸刺激对人体细胞特性影响的研究

许庆庆¹ 段甦¹ 翟所强¹ 张罗¹

[摘要] 目的:探索体外培养的体细胞经过低 pH 处理后的特性和分化特征,为感音神经性聋提供新的治疗策略。**方法:**选取人成熟体细胞作为目标细胞,选择几种 pH 值不同溶液分别处理细胞,对细胞的形态进行观察,从碱性磷酸酶(AKP)活性、免疫组织化学染色、分子生物学等方面对细胞的特性进行鉴定,选出最适应 pH 值。对诱导后细胞体外进行神经定向诱导,再将基膜以胆红素处理,建立感音神经性聋体外模型,验证诱导后细胞的体外分化能力以及治疗功能;验证方法为形态学、AKP 活性、免疫组织化学、分子生物学等手段。**结果:**实验组细胞生长明显优于对照组;实验组 AKP 活性高于对照组; Nanog 和 Oct4 的表达在 2 组均为阳性;将处理后的细胞转移到神经干细胞培养液中, Nestin 表达阳性。**结论:**低 pH 处理后的人体细胞显示出与诱导多能干细胞相似的特性,但其功能和治疗效果有待进一步研究。

[关键词] 低 pH 值;形态学;碱性磷酸酶;免疫荧光

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2019.07.005

[中图分类号] R764.3 **[文献标志码]** A

Experimental study on the effect of acid stimulation on human cell characteristics

XU Qingqing DUAN Su ZHAI Suoqiang ZHANG Luo

(Department of Otorhinolaryngology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: ZHANG Luo, E-mail: dr.luozhang@139.com

Abstract Objective: The purpose of the present study was to explore the characteristics and differentiation of somatic cells in vitro undergoing a low pH treatment, so as to provide new therapeutic strategies for treating sensorineural hearing loss. **Method:** The human mature somatic cells were selected as the target cells, and the cells were treated with different pH values to observe the cell morphology. The cell characteristics were identified from alkaline phosphatase (AKP) activity, immunohistochemical staining and molecular biology, and the most suitable pH value was selected. In addition, a mouse model of the cochlear lesion was constructed using bilirubin. Subsequently, the characteristics and therapeutic effect of somatic cells undergoing low pH treatment were examined by morphology, AKP activity, immunofluorescence assay and Q-PCR. **Result:** The cell growth of the experimental group was significantly better than those in the control group. The activity of AKP in the experimental group was higher than that in the control group. The expression of Nanog and Oct4 was both positive in the two groups. When the cells were changed to neurobasal medium, the marker of Nestin was positive. **Conclusion:** The human somatic cells undergoing a low pH treatment showed the similar characteristics as those of induced pluripotent stem (iPS) cells; although the functions and therapeutic effect of these altered human somatic cells need to be further studied.

Key words low pH; morphology; alkaline phosphatase; immunofluorescence assay

全世界数百万人存在不同程度的感音神经性听力损失,而感音神经性聋大多是由内耳感音细胞的受损引起的,比如毛细胞和螺旋神经节神经元的缺失。所以,受损的内耳感音细胞的修复是治疗感音神经性听力损失的主要挑战。人类诱导多能干细胞(iPS)细胞系^[1-2]的引入为特异性细胞的产生铺平了道路,并为疾病模型的建立提供了强有力的工具^[3]。基于 iPS 的细胞治疗的临床试验已经开始用于一些神经性疾病,包括脊髓损伤和年龄相关

性黄斑变性等^[4]。从人体细胞获得 iPS 细胞的方法有多种,如细胞核转移^[5-6]和几种转录因子的使用^[7-8]。然而,这些方法获得 iPS 细胞的效率非常低,很难满足临床以及试验需求。剧烈的环境变化可将成熟的体细胞转化为未成熟细胞状态^[9]。虽然这种获取细胞的方法引发了一些争议^[10-12],但它可能是最简单、最有效的方法。本实验采用这种方法获得 iPS 细胞,并进一步将其诱导成神经干细胞,为临床治疗感音神经性聋提供细胞来源。

在所有这些可引起细胞状态改变的剧烈环境变化中,我们选择低 pH 值法^[13],验证其对人体细胞多能性的产生和相关基因表达的影响。随后,将

¹首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉科(北京, 100853)
通信作者:张罗, E-mail: dr.luozhang@139.com

这些人体细胞进一步诱导成神经干细胞,并与受损的感音神经性聋体外模型共培养,研究它们对受损神经细胞的修复作用。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

实验动物选择出生后 3 d 的小鼠(P3),购自军事医学科学院实验动物中心。人肝 LO-2 细胞系购自福祥生物技术有限公司(上海)。

1.2 细胞收集以及低 pH 处理

选取 LO-2 细胞系,于高糖 DMEM 加 10% FBS 加 2% P-S 培养液中,37℃,5% CO₂ 温箱中孵育,培养 7 d。选出长势及密度相似的细胞 8 瓶,分为 A、B、C、D 组,每组 2 个 25 cm² 培养瓶,做好标记。其中 A 组标记为 5.3, B 组标记为 5.7, C 组标记为 5.7a, D 组标记为 7。用 10% 的稀盐酸将 HBSS 溶液分别滴定至 pH 5.3 和 pH 5.7。A 组用 30 μl 左右(1×10⁶/500 μl) pH 5.3 的 HBSS 滴定, B、C 组用 pH 5.7 的 HBSS 滴定(其中 B 组比 C 组早 3 d 处理, A、C、D 组处理时间一样), D 组为空白对照组,加入等量 PBS, 37℃ 孵箱中放置 25 min。后将 4 组细胞室温 10 000 r/min 离心 5 min, 将收集到的细胞重新放入 DMEM/F12 培养液(1:1 DMEM/F12, Gibco)加 10% 胎牛血清加 1% 链霉素/青霉素(Gibco)的 75 mm² 培养瓶(1×10⁵ 细胞/ml)中, 2 周后传代。

1.3 低 pH 处理后细胞特性鉴定

1.3.1 碱性磷酸酶活性 碱性磷酸酶(AKP)活性检测试剂盒、总蛋白定量测试盒(BCA 法)均购自南京建成生物公司。根据说明书测量各组的 AKP 活性。紫外分光光度法(UV-2550, Dao Jin)测定样品的吸收度值。

1.3.2 免疫组织化学检测 低 pH 溶液处理后的细胞用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 在 PBS 中洗涤 3 次, 每次 5 min; 0.25% Triton X-100/PBS 透化 30 min, PBS 中洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 500 μl 10% FBS 封闭 30 min, 向 24 个孔中分别加入 200 μl PBS 溶液以 1:200 稀释的 Anti-Nanog, Anti-Oct4, Anti-SSEA-4, Anti-Ecadherin, 使抗体覆盖所有细胞, 4℃, 过夜; 12 h 后将一抗吸尽, 向每孔中加入 500 μl PBS 溶液, 轻晃培养板洗净一抗, 重复洗涤 3 次, 每次 10 min; 向每孔中加入 200 μl 用 PBS 溶液以 1:200 比例稀释的二抗, 用锡纸将培养板包好, 放入培养箱中 37℃ 避光孵育 1 h; 将二抗吸尽, 向每孔中加入 500 μl PBS 溶液洗涤, 重复洗涤 3 次, 该步骤避光操作, 每次 5 min; 每孔中加入 200 μl DAPI 染色液, 用锡纸包好, 放入培养箱中 37℃ 避光孵育 30 min; 吸去 DAPI, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 细胞爬片取出后置于防脱片载玻片上, 轻轻拭去周围水分, 封片剂封片, 晾干后置

于湿盒保存, 激光共聚焦显微镜(Zeiss 780)下观察染色情况, ZEN-2011 软件对各组图像进行分析。OcT4, SSAE-4 Nango 和 E-cadherin(1:100)的一抗购自 Abcam, 而 Alexa FluorR 647 驴抗 Mouse IgG(1:200, Abcam)和 Alexa FluorR 555 山羊抗兔 IgG(1:200, InTigEngy)用作二抗。

1.3.3 RNA 的制备及 Q-PCR 分析 用 RNeasy Micro kit(Qiagen)提取细胞总 RNA, 逆转录过程使用 SuperScript III first strand synthesis kit(Invitrogen), 扩增过程使用铂 Taq DNA 聚合酶, RNaseOUT 重组核糖核酸酶抑制剂和 10 μm dNTP 溶液, Q-PCR 反应在 QPCR 仪(Invitrogen)上用 SYBR Green Nucleic Acid 测定进行。

1.4 神经干细胞的分化与鉴定

将 2 组细胞用胰蛋白酶消化, 离心 5 min, 去上清, 将细胞悬液放入 iPS 培养液(KokOut™ DMEM 培养液, Gibco)加 20% 去血清替代物(Gibco)加 1% NEAA(Gibco)加 1 mmol/L L-谷氨酰胺(Gibco)加 0.1 mmol/L β-巯基乙醇+4 μg/L 碱性成纤维细胞生长因子(PEPRO)中培养, 培养液每隔 4 d 更换一次。然后将 5 μmol/L 的 RA(维甲酸, Sigma)添加到培养液中, 培养液依然每隔 4 d 更换一次。细胞消化后再于含有 N2(DMEM/F12, 1:1, Gibco)加 1% N2 补充剂加 1% 的 L-谷氨酰胺加 1% NEAA 加 1% p/s 的新培养液中培养 2 d。更换为 N2B27 神经基础培养液(Gibco), 包含 2% B27(Gibco)加 1% 的 L-谷氨酰胺加 1% NEAA 加 1% P/S, 最终是 N2 培养液和 B27 培养液以 1:2 比例混合, 然后加入 bFGF(20 ng/ml, Pepro Tech), EGF(20 ng/ml, Gibco)和 IGF(100 ng/ml, Pepro Tech)。1 周后, Nestin(1:200, Abcam)常规免疫荧光染色, 共聚焦显微镜下观察(Zeiss 780)。

1.5 感音神经性聋体外模型的建立

耳蜗基膜(BM)取自 P3 小鼠, 放置于鼠尾胶(BD Biosciences), BME(培养液 Egle, Sigma)和 NaHCO₃ 以 9:1:1 固定。加入含有 1% 血清的 DMEM/F12 培养液中孵育 12 h。然后在培养液中加入用 50 μmol/L 胆红素(Sigma), 24 h 后将胆红素洗去。

1.6 分化的神经干样细胞对 BM 的治疗作用

分化的神经干样细胞与 BM 在含有 bFGF、EGF 和 IGF 生长因子的 N2B27 培养液共培养 3~7 d, 隔天换液。选择 Nestin(1:100, Abcam), Tublin(1:100, Abcam), NF200(1:100, Abcam)作为一抗进行免疫组织化学染色, 在共聚焦显微镜下观察玻片(Zeiss 780)。

1.7 统计学分析

数据使用 *t* 检验进行统计学分析。以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用低 pH 溶液处理后细胞的特性

F12 培养液中培养 7 d 后,由 4 组细胞酸处理 2 周后的形态图(图 1a~1d)可见 4 组细胞长势均好,密度上看 A、B 组密度稍大于 C、D 组,D 组稍大于 C 组,A 组稍大于 B 组。可见 pH 5.3 为最适宜

pH,培养时间长短对细胞长势有影响,时间越长,长势越快。免疫组织化学结果显示,4 组 Nanog 染色表达均为阳性(图 2),阳性细胞个数 A 组>B 组>D 组>C 组(图 3);4 组 Oct4 染色表达均为阳性(图 4),阳性细胞个数 A 组>B 组>D 组>C 组(图 5)。4 组 SEEA4、E-cadherin 染色表达均为阴性(图 6,7)。

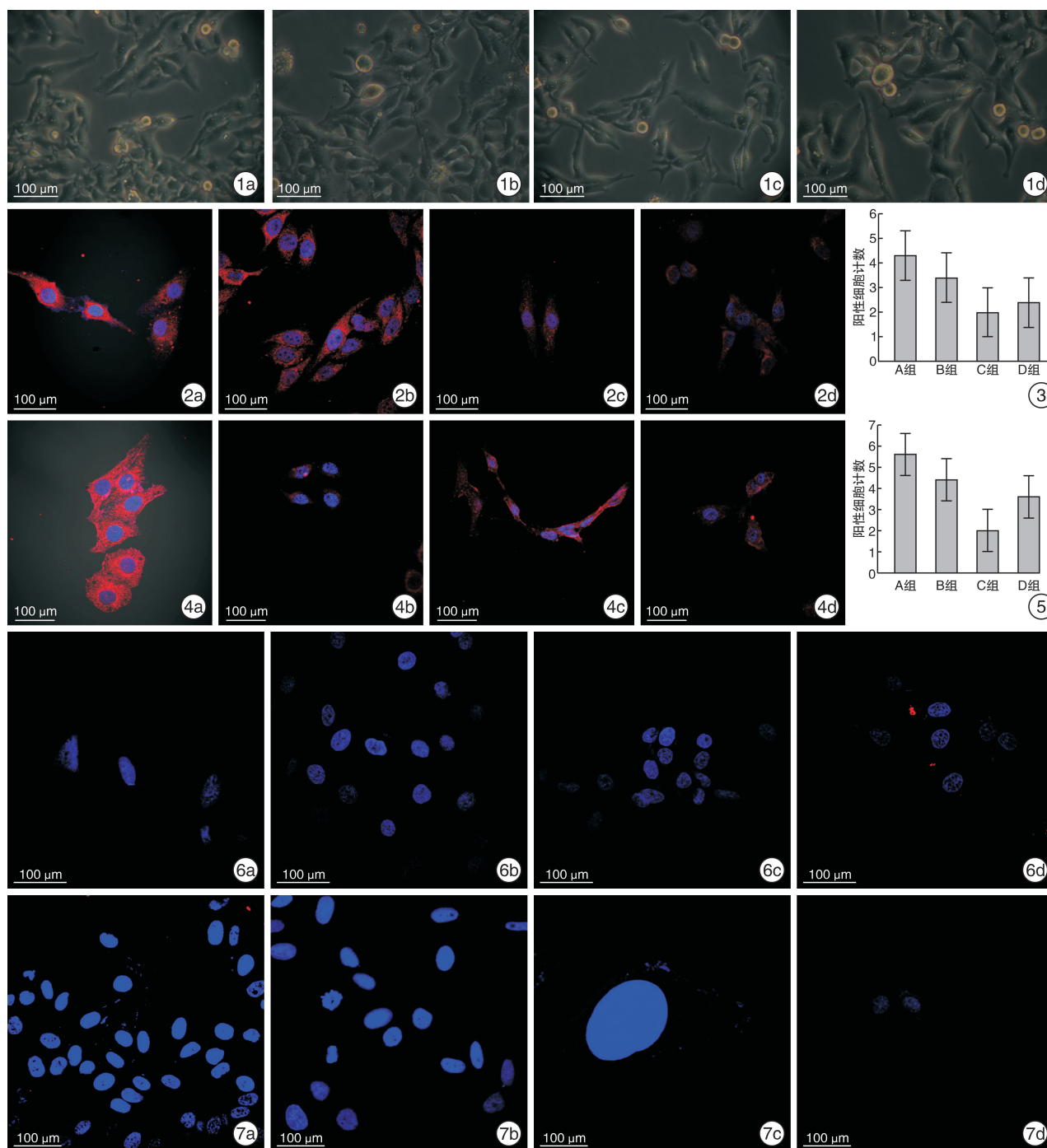


图1 酸处理后各组细胞形态($\times 20$) 1a:A组;1b:B组;1c:C组;1d:D组; 图2 4组细胞 Anti-Nanog 的染色结果($\times 20$) 2a:A组;2b:B组;2c:C组;2d:D组;红色为抗体颜色,蓝色为 DAPI; 图3 Nanog 阳性细胞荧光计数; 图4 细胞 Anti-Oct4 染色结果($\times 20$) 4a:A组;4b:B组;4c:C组;4d:D组;红色为抗体颜色,蓝色为 DAPI; 图5 Oct-4 阳性细胞染色计数; 图6 4组细胞 SEEA4 染色结果($\times 20$) 6a:A组;6b:B组;6c:C组;6d:D组;红色为抗体颜色,蓝色为 DAPI; 图7 4组 E-cadherin 染色结果($\times 20$) 7a:A组;7b:B组;7c:C组;7d:D组;红色为抗体颜色,蓝色为 DAPI。

4 组 AKP 活性(图 8)分别为:A 组 2.55、B 组 1.99、C 组 0.09、D 组 0.57,差异有统计学意义。

Q-PCR 结果(图 9)见 4 种基因量均为 A 组最高,且 A 组>B 组>D 组>C 组;Nanog 与 Oct4 明显高于 SEEA4 与 E-cadherin,差异有统计学意义。以上结果说明,低 pH 处理后细胞的特性与 iPS 细胞不完全相同,最佳 pH 为 5.3。

将细胞转移到 N2B27 培养液中,细胞 AKP 的活性逐渐降低,实验组(pH 5.3) AKP 值为 0.095,对照组为 0.097,2 组差异有统计学意义。免疫组织化学结果显示,实验组神经干样细胞成簇生长,Nestin 表达阳性(图 10a、10b),但是这些神经干样细胞与典型的神经干细胞形态仍存在差异。Q-PCR 结果显示,4 种标记物蛋白含量在实验组都减少(图 11),说明处理后细胞比对照组分化趋势更明显。

2.2 诱导后细胞的功能特性

使用胆红素建立内耳损伤的感音神经性聋体外模型(图 12a、12b),验证诱导后的细胞是否对受损耳蜗神经具有修复功能。用共聚焦显微镜观察 Nestin、 β -tublin 和 NF-200 抗体的表达,实验组和对照组共培养结果显示,2 组 BM 处都可见神经干样细胞存在(图 13a、13b),但在实验组更加密集、荧光更强,2 组的分布部位都在螺旋神经节处(图 14),但更多分布于耳蜗之外的鼠尾胶处。

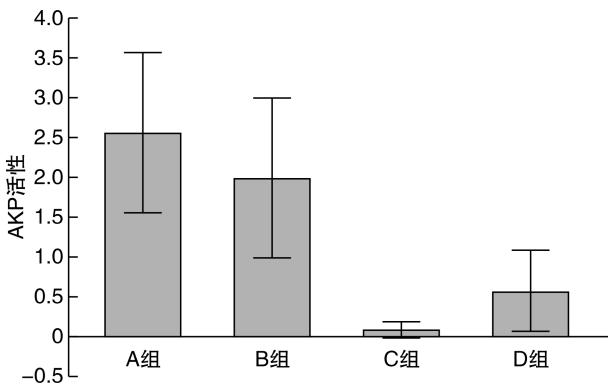


图 8 AKP 活性曲线

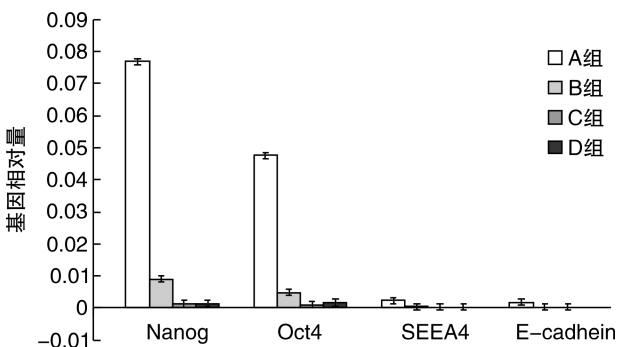
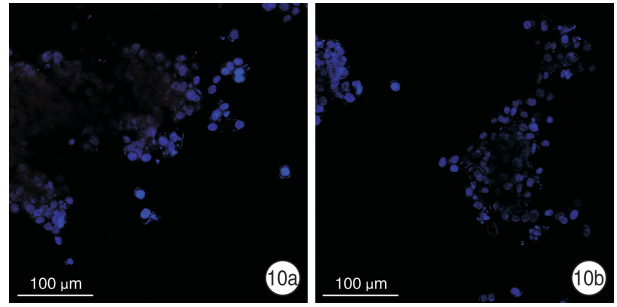


图 9 4 种基因相对定量结果



10a:实验组,10b:对照组;红色代表抗体,蓝色为 DAPI。

图 10 实验组与对照组 Nestin 染色情况(×20)

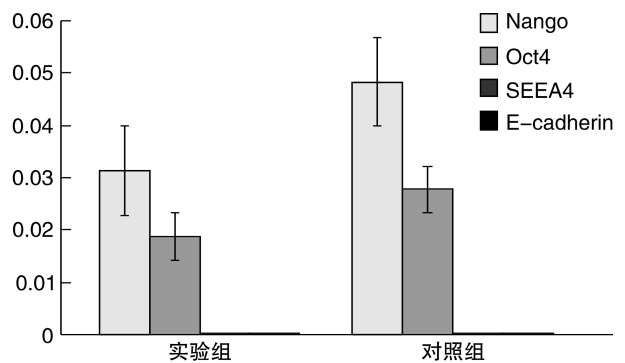
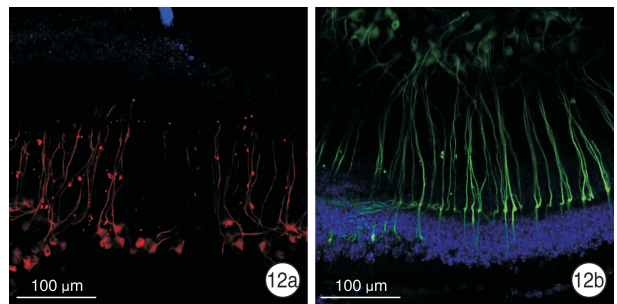
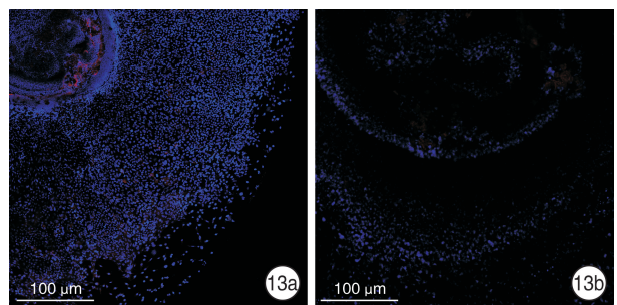


图 11 实验组与对照组 Q-PCR 结果



12a:实验组,红色为抗体 Anti-tubulin,蓝色为 DAPI 染料;12b:对照组,绿色为抗体 Anti-tubulin 颜色,蓝色为 DAPI 染料。

图 12 正常 BM 与胆红素处理后 BM 形态图(×40)



13a:实验组;13b:对照组;红色为 Anti-NF-200,蓝色为 DAPI 染料。

图 13 实验组与对照组共培养结果(×20)

3 讨论

本研究建立起了一种从体细胞获得 iPS 细胞的实验方法。主要研究目的是为临床感音神经性聋的干细胞治疗提供细胞来源。虽然现在获得 iPS 细胞的方法有很多,但最终获得的细胞数量太少,并不能满足临床治疗的需要。

细胞作为生命的最小单位,无论在体内还是人工培养环境中存在都会受到其生长环境的影响,进而产生特定的生理变化。人体细胞具有潜在的可塑性,称为多能分化性。但这种可塑性在体细胞存活的一般环境中不会出现,只有在强烈刺激后才出现。

近年来,越来越多的研究者对细胞存活的微环境,特别是针对肿瘤细胞或干细胞的一些目标阳性试验药物以外的常见因子,如环境酸碱性和糖、盐以及尿素浓度(来自细胞自身代谢积累或者基因工程蛋白变性纯化中残存的尿素)表现出极高的兴趣,本身具有一定的生理耐受性和对细胞生长的敏感性,进而在一定程度上影响目标试验的结果。为体内微环境因子对癌细胞的生存发展的影响,以及抗癌、防癌提供了一定程度的参考或启示。pH 值可能影响蛋白质的活性,而细胞膜上的协助物质运输的载体蛋白可帮助各种无机盐、葡萄糖等小分子进入细胞内,因此是细胞对营养物质的吸收能力改变而影响了细胞活性。

鼠类的 ESC 细胞在有 Lif/Stat3 以及 Bmp/Smad/Id 信号存在的情况下会维持它的可以自我更新的多能性状态^[14],还有一种情况,就是被称为“2i”的 2 种化学抑制剂的存在,即 MAP 酶 Erk1 和 Erk2 以及糖原合成酶激酶 3(Gsk3)^[15]的存在也会维持细胞的多能性状态。核心多能性基因组靶点的 3 个组合因 Oct4、Sox2 和 Nanog,频繁被下游的效应蛋白 Lif 和 Bmp 信号、Stat3、Smad1 以及组蛋白乙酰转移酶 p300 等占据^[16],所以在生长因子信号中,核心多能性网络以及染色质调控之间建立了连接。细胞多能性相关的标记蛋白^[17]有 Oct4、SEEA4、Nanog 和 E-cadherin 以及标记基因 Oct4、Nanog、Sox2、Ecat1(也叫 Khdc3)、Esg1(Dppa5a)、Dax1(Nrobl)以及 Rex1(Zfp42)^[18]。我们选取人类多能性细胞的标志性蛋白基因 Oct4、SEEA4、Nanog 和 E-cadherin 来作为目标参数对细胞状态进行检测。至于多能性状态改变的深层次原因,例如是否为多能性标记基因层面上调控序列甲基化的改变,或者只是适应环境的暂时性选择适应现象,尚需进一步验证。

许多环境刺激,如温度、酸刺激和振动等可以改变细胞所处状态。在适用于人细胞的刺激中,我们选择了低 pH。原因有:①Oct4 是参与胚胎干细胞自我更新和多能性维持的转录因子之一;②Oct4

也是体外诱导 iPS 细胞的关键基因,低 pH 处理可诱导 Oct4 基因的表达,其次,“亚致死”条件下的短暂低 pH 处理可以改变组织的分化状态;③在 pH 低于 6 的柠檬酸盐酸性递质中浸泡蝾螈动物帽的组织可以诱导细胞发生神经转化^[19]。为探讨低 pH 处理后神经干样细胞产生的可行性,我们先研究了低 pH 处理后细胞的特征,并将处理后的细胞进一步进行神经干诱导,验证其对感音神经性聋体外动物模型的治疗作用。

在本研究中,人体细胞在用低 pH 溶液处理后可以表达干细胞的标记物,表明这种物理刺激可以影响细胞命运,并且对于细胞重编程可能是必需的。所以,细胞暴露于低 pH 溶液中可诱导人体细胞中某些多能性基因的表达,证明低 pH 刺激可以作为产生 iPS 细胞的方法之一的可行性。

但是我们的研究发现,诱导后类神经干细胞样细胞在与感音神经性聋体外模型共培养时,并没有大量的细胞出现在神经区域,而是出现在了 BM 之外的区域。这是我们未来需要解决的问题,可以尝试用特定的诱导剂来促进螺旋神经节细胞的植入。有研究发现,支配神经元的电生理特征在高频率区域和低频区域之间是不同的^[20]。因此,未来可以尝试电刺激方法使更多的细胞进入到耳蜗神经分布区域^[21]。另外,其他类型的刺激,例如物理损伤、渗透压休克、热休克或高 Ca^{2+} 暴露,或许也可以改变体细胞的多能性状态。所以,这些刺激下细胞状态改变的机制也值得进一步研究。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131: 861—872.
- [2] YU J Y, VODYANIK M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318: 1917—1920.
- [3] TISCORNIA G, VIVAS E L, BELMONTE J C. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells[J]. Nature Med, 2011, 17: 1570—1576.
- [4] TAKAHASHI J. Stem cells and regenerative medicine for neural repair[J]. Curr Opin Biotechnol, 2018, 52: 102—108.
- [5] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126: 663—676.
- [6] THORPE T A. History of plant tissue culture[J]. Mol Biotechnol, 2007, 37: 169—180.
- [7] BERG J S, GOODELL M A. An argument against a role for Oct4 in somatic stem cells[J]. Cell Stem Cell,

- 2007;1:359—360.
- [8] D'IPPOLITO G, DIABIRA S, HOWARD G A, et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2971—2981.
- [9] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL F R, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4ISSEA-11Oct-41 stem cells identified in adult bone marrow[J]. *Leukemia*, 2006, 20: 857—869.
- [10] KURODA Y, KITADA M, WAKAO S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 8639—8643.
- [11] LENGNER C J, WELSTEAD G G, JAENISCH R. The pluripotency regulator Oct4: a role in somatic stem cells[J]? *Cell Cycle*, 2008, 7: 725—728.
- [12] OBOKATA H, KOJIMA K, WESTERMAN K, et al. The potential of stem cells in adult tissues representative of the three germ layers[J]. *Tissue Eng*, 2011, 17: 607—615.
- [13] XU Q Q, GUO W W, WANG X, et al. Acid stimulation-induced semi-pluripotent characteristics in human somatic cells[J]. *Acta Otolaryngol*, 2019, 8: 1—7.
- [14] WRAY J, KALKAN T, SMITH A G. The ground state of pluripotency[J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38: 1027—1032.
- [15] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Nature*, 2008, 453: 519—23.
- [16] ANG Y S, TSAI S Y, LEE D F, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network[J]. *Cell*, 2011, 145: 183—197.
- [17] BRONS I G, SMITHERS L E, TROTTER M W, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos [J]. *Nature*, 2007, 448: 191—195.
- [18] NIWA H. How is pluripotency determined and maintained[J]? *Development*, 2007, 134: 635—646.
- [19] BYRNES W M. Ernest Everett Just, Johannes Holtfreter, and the origin of certain concepts in embryomorphogenesis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76: 912—921.
- [20] ADAMSON C L, REID M A, MO Z L, et al. Firing features and potassium channel content of murine spiral ganglion neurons vary with cochlear location[J]. *J Comp Neurol*, 2002, 447: 331—350.
- [21] CHEN W, JONGKAMONWIWAT N, ABBAS L, et al. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors [J]. *Nature*, 2012, 490: 278—282.

(收稿日期: 2019-03-10)

(上接第 592 页)

血管内压力升高导致血管破裂。必要时可选用鼻内镜下鼻腔皮成形术治疗严重鼻出血^[5]。此外,可药物治疗,如沙利度胺具有免疫调节及抗血管生成作用,治疗 HHT 患者皮肤黏膜出血及胃肠道出血疗效确切且相对安全,可长期应用。另外对于严重的遗传性毛细血管扩张症引起的鼻出血患者,亦可考虑试用抗血管内皮生长因子贝伐珠单抗进行治疗^[6]。

参考文献

- [1] 岳健,孙宇新,辛伟红,等. 遗传性出血性毛细血管扩张症一家系调查[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 24(21): 999—1000.
- [2] 贾婧杰,张静,赵立东,等. II 型遗传性毛细血管扩张症临床特点和 ACVRL1 基因筛查[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(16): 1107—1111.
- [3] 籍灵超,贾婧杰,张静,等. 遗传性出血性毛细血管扩张症诊断和治疗国际指南[J]. *中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)*, 2014, 29(1): 40—55.
- [4] 张树贤,任玲,徐静,等. 遗传性出血性毛细血管扩张症一家系诊断与治疗研究[J]. *临床医药实践*, 2017, 26(1): 10—13.
- [5] 林家峰,陈剑秋,王宝东,等. 遗传性出血性毛细血管扩张症 1 例及家系报告[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(3): 209—211.
- [6] DUPUIS-GIROD S, GINON I, SAURIN J C, et al. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and hepatic vascular malformations and high cardiac output[J]. *JAMA*, 2012, 307: 948—949.

(收稿日期: 2019-04-05)