DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2018.06.012 ·论著:基础医学·

沉默 Chk2 基因对 DADS 阻滞人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 期的影响

谭亚丽[1,2],夏 红[1#],曾 颖[1],刘 芳[1],苏 波[1],曾 希[1],苏 琦[1*]

(1.湖南省肿瘤细胞与分子病理学重点实验室,湖南省胃癌研究中心,南华大学肿瘤研究所,湖南 衡阳 421001;2.湖南省中医高等专科学校附属一医院肿瘤科)

摘 要: 细胞周期检测点激酶 1/2(Chk1/2)在参与 G2/M 期起着重要作用,本研究探讨沉默 Chk2 基因对二烯丙基二硫(DADS)诱导人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 期阻滞的影响。采用 RNAi 技术沉默 BGC823 细胞 Chk2 基因,q-PCR 与 Western blot 检测 Chk2 mRNA 与蛋白表达。流式细胞术检测 DADS 与 Chk2 沉默 BGC823 细胞周期分布情况。Western blot 检测 Cdc25C 与 cyclin B1 表达。流式细胞术显示,DADS 作用 BGC823 细胞后,G2/M 期细胞呈时间依赖性增加 ($P<0.05$)。Chk2 沉默 BGC823 细胞 Chk2 mRNA 与蛋白表达下调 ($P<0.05$)。Chk2 沉默组 G2/M 期细胞较对照组差异无显著性 ($P>0.05$)。DADS 处理 Chk2 沉默组与对照组后,两者 G2/M 期细胞差异无显著性 ($P>0.05$),而较未处理前有明显差异 ($P<0.05$)。Chk2 沉默后,CDC25C 和 CyclinB1 表达较对照组无明显差异 ($P>0.05$)。但是,DADS 处理对照组与 Chk2 沉默组后,CDC25C 和 CyclinB1 表达较处理前明显降低 ($P<0.05$)。表明 Chk2 沉默对 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 作用没有影响,DADS 阻滞 G2/M 的检查点可能不是 Chk2。

关键词: 人胃癌 BGC823 细胞; 二烯丙基二硫; Chk2; 基因沉默; G2/M 期

中图分类号:R735.2;R730.5 **文献标识码:**A

Silencing Chk2 gene impact the G2/M in gastric cancer BGC823 cells by DADS

TAN Yali, XIA Hong, ZENG Ying, LIU Fang, SU BO, ZENG Xi, SU Qi

(*Cancer Research Institute*, *University of South China*, *Hengyang* 421001, *Hunan*, *China*)

Abstract: Cell cycle checkpoint kinase 1/2(chk1/2) plays an important role in the G2/M phase. This study is to investigate the effect of silent Chk2 gene on the G2/M arrest in gastric cancer BGC823 cells induced by diallyl disulfide (DADS). Using RNAi technology to silence the Chk2 gene, q-PCR and Western blot were used to detect Chk2 mRNA and protein expression. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution of DADS and silencing Chk2. The expression of Cdc25C and Cyclin B1 was detected by Western blot. flow cytometry showed that the cells of G2/M increased in a time-dependent manner after DADS treated BGC823 cells ($P<0.05$). After silence Chk2 gene, Chk2 mRNA and protein expression were down-regulated ($P<0.05$). There was no significant difference in the G2/M phase cells in the Chk2 silent group ($P>0.05$). There was no significant difference between the G2/M cells in the G2/M period after DADS treated Chk2 silent group and the control group ($P>0.05$), while there was a significant difference before the treatment ($P<0.05$). After silence Chk2, the expression of CDC25C and CyclinB1 was not significantly different from that in the control group ($P>0.05$). However, the expression of CDC25C and CyclinB1 was significantly lower than that before treatment after DADS treated control group and Chk2 silent group ($P<0.05$). It indicates that Chk2 silence had no effect on the G2/M effect of DADS blocking BGC823 cells, and the checkpoint for DADS block G2/M may not be Chk2.

Key words: gastric cancer BGC823 cells; diallyl disulfide; Chk2; gene silencing; G2/M

研究表明,在对 DNA 损伤的反应中,细胞周期检查点可在 G1 期、S 期和 G2/M 过渡中激活,检查点激酶 1(checkpoint kinase1,Chk1)与检查点激酶 2(checkpoint kinase 2,Chk2)是 G2/M 期检查点的两

收稿日期:2018-07-05;**修回日期:**2018-10-11

基金项目:国家自然科学基金(81641112, 81374013).

* **通信作者,**E-mail:suqi1945@163.com.# 并列第一作者.

个关键激酶。近年来,采取 DNA 损伤药物与靶向 Chk1/2 药物相结合,显著提高治疗效果[1]。

二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)是一种从大蒜中提取的脂溶性有机硫化合物,可抑制多种恶性肿瘤细胞增殖[2]。本实验室前期工作表明,DADS 能明显抑制人胃癌 MGC803 细胞增殖和阻滞 G2/M 期,与激活 p38 通路、抑制 ERK/AP-1 通路有关[3-4]。并且,Chk2 基因高表达可促进 DADS 阻滞 MGC803 细胞 G2/M 期的作用[5]。本文研究沉默 Chk2 基因对 DADS 阻滞人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 期的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 人低分化胃癌细胞株 BGC823 由本实验室保存。DADS 为 Fluka 公司产品。BCA 蛋白定量试剂盒为 Pierce 公司产品。siRNA 转染试剂、siRNA 转染培养基及 Chk2 siRNA、Lipofectamine2000、Chk2、Cyclin B1 与 β-actin 抗体及 ECL 发光检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司。Cdc25C 鼠单克隆抗体(NeoMarkers 公司)。新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司。引物利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,由上海生工公司合成。

1.2 细胞培养 BGC823 细胞用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养于 37 ℃,含 5%CO_2,恒湿恒温培养箱中培养。细胞铺满培养瓶后传代,0.175%胰蛋白酶消化 3 min,倾去胰酶,加适量含血清培养液吹打成单细胞悬液,按所需浓度接种。转染 Chk1 BGC823 细胞用含 200 μg/mL G418、10%小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养于 37 ℃,含 5%CO_2,恒湿恒温培养箱中培养。细胞呈单层生长,铺满培养瓶后传代,传代时常规吸去培养液,用 0.175%胰蛋白酶消化 3 min,倾去胰酶,加适量含血清培养液吹打成单细胞悬液,按所需浓度接种。

1.3 siRNA 沉默 Chk2 基因 Chk1 小干扰 RNA (siRNA)按照说明书,3×10^5/孔 BGC823 细胞接种于 6 孔板中,siRNA 稀释于 siRNA 转染培养基中,与 Lipofectamine2000 混合,在 siRNA 最终浓度为 100 nmol/L 时进行转染,非特异性 siRNA 转染作为对照。qRT-PCR 和 Western blot 检测 RNA 干扰的效果。设计并合成 q-PCR 引物:Chk2:F 5-′CTCG GGAGTCGGATGTTGAG-3′, R 5′-GA GTTTGGCAT CGTGCTGGT-3′,产物长度 142 bp;β-actin:F 5′ ATCTGGCACCAC ACCT3′, R 5′CGTCATACTCCT-GCTT3′,产物长度 203 bp。各基因扩增条件:Chk2:95 ℃ 5 min,35 个 PCR 循环(95 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,86.5 ℃ 5 s;GAPDH:95 ℃ 5 min,35 个 PCR 循环(95 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,86 ℃ 5 s。检测结果进行标准曲线分析,对待测样品的目的基因进行定量。

1.4 流式细胞仪检测 收集培养细胞,离心 1 000 rpm×5 min,用预冷 PBS 液重悬细胞,离心 1 000 rpm ×5 min,重复一次;将收集的细胞用 4 ℃预冷的 75%乙醇固定细胞,冰盒送检。样本上机前,将乙醇固定的细胞离心洗涤,去上清,摇匀;加 RNA 酶 0.5 mg/mL 50 μL,37 ℃水浴 30 min;加碘化丙啶 1 mg/mL 50 μL,振荡混匀,置冰箱 30 min;300 目尼龙网滤过,计数 10 000 个细胞,上机进行细胞周期和 DNA 含量分析。

1.5 Western blot 检测 收集 1×10^6 个细胞,加 100 μL 裂解液,冰上裂解 1 h,低温高速离心收集蛋白,BCA 蛋白定量测定蛋白浓度。每孔加 30 μg 蛋白,以 5∶1 体积与 5×SDS 缓冲液混合,100 ℃ 5 min,10%SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上,用含 5%脱脂牛奶的 TBST(Tris-HCl 20 mmol/L, NaCl 137 mmol/L 含 0.1%Tween-20)封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次,一抗 37 ℃孵育 2 h,TBST 洗 3 次,每次 15 min,二抗孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,化学发光剂检测蛋白质印迹,薄层扫描仪测定印迹区带的光密度值。

1.6 统计学处理 所有结果数据以均数±标准差表示,用统计学软件 SPSS13.0 进行数据分析,采用 t 检验或 one-way ANOVA 比较组间差异, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 流式细胞检测 根据文献[6],采用 15 mg/L DADS 作用 BGC823 细胞 12、24、36、48 h 后,G2/M 期细胞分别为 20.4%、39.5%、32.8%、20.03%较对照组的 10.1%、16.6%、14.7%、13.5%均明显增加($P<0.05$),表明 DADS 可呈时间依赖性阻滞 BGC823 细胞 G2/M 期(表 1)。

2.2 Chk2 沉默对 BGC823 细胞 Chk2 表达的影响 为了确定 Chk2 是否影响 DADS 诱导 G2/M 阻滞,通过 RNA 干扰沉默 Chk2 基因,实验分为对照组、空载体组与 Chk2 沉默组。q-PCR 与 Western blot 检测结果显示,BGC823 细胞经 Chk2 siRNA 转染 24 h 后,

Chk2 mRNA 与蛋白表达下调（$P<0.05$）（图 1，图 2）。

表 1　DADS 对 BGC823 细胞周期的影响（$n=3$）

组别	时间	G1	S	G2/M
对照组	12h	45.6±5.31	44.3±5.59	10.1±2.20
	24h	49.8±7.51	33.6±8.26	16.6±1.88
	36h	50.7±1.09	34.63±1.07	14.7±0.93
	48h	51.1±6.67	35.4±7.15	13.5±0.76
DADS 组	12h	47.9±3.47	31.7±4.14	20.4±1.12[a]
	24h	28.2±9.07	35.0±7.23	39.5±2.90[a]
	36h	33.5±4.47	35.5±3.19	32.8±0.87[a]
	48h	40.13±0.98	35.8±7.6	20.03±2.45[a]

与对照组相同时间比较，[a]$P<0.05$

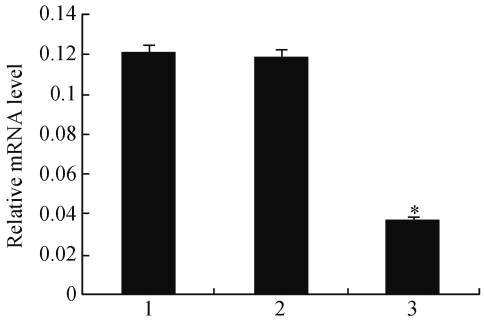

图 1　Chk2 沉默对 BGC823 细胞 Chk2 mRNA 表达的影响

1：对照组；2：空载体组；3：si-Chk2 沉默组

与对照组和空载体组比较，* $P<0.05$

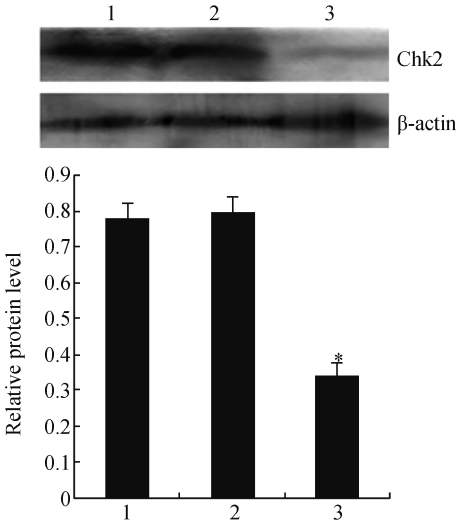

图 2　Chk2 沉默对 BGC823 细胞 Chk2 蛋白表达的影响

1：对照组；2：空载体组；3：si-Chk2 沉默组

与对照组和空载体组比较，* $P<0.05$

2.3　Chk2 沉默对 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 期的影响　结果显示，Chk2 沉默组 G2/M 期细胞 15.4%较空载体组 14.2%差异无显著性（$P>0.05$）。经 DADS 处理后，Chk2 沉默组与对照组 G2/M 期细胞分别为 31.1%与 33.2%（$P>0.05$），但是，较未处理 Chk2 沉默组与对照组明显增加（$P<0.05$，见图 3）。表明 Chk2 沉默对 BGC823 细胞 G2/M 无影响，也不影响 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 的作用。

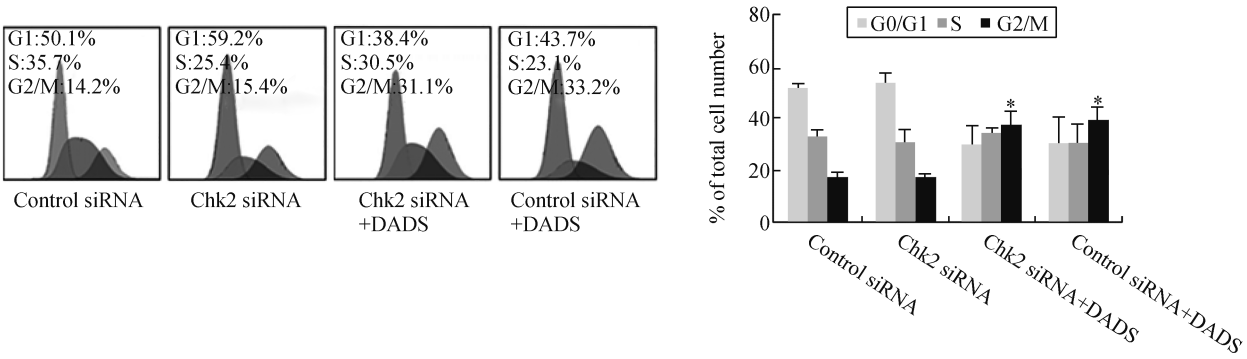

图 3　Chk2 沉默对 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 期的影响

2.4　Chk2 沉默对 DADS 作用 BGC823 细胞 Cdc25C 与 cyclin B1 表达的影响　Western blot 检测结果显示，Chk2 基因沉默后，CDC25C 和 CyclinB1 表达较对照组差异无显著性（$P>0.05$）。但是，15 mg/L 的 DADS 处理对照组与 Chk2 沉默组后，CDC25C 和 CyclinB1 表达水平较对照组明显降低（$P<0.05$），而 DADS 处理对照组与 Chk2 沉默组之间差异无显著性（$P>0.05$，见图 4）。表明沉默 Chk2 对 CDC25C 和 CyclinB1 表达没有影响，而且对 DADS 作用也没有影响。

3　讨　论

大量研究表明，许多靶向 Chk1/2 药物可阻滞

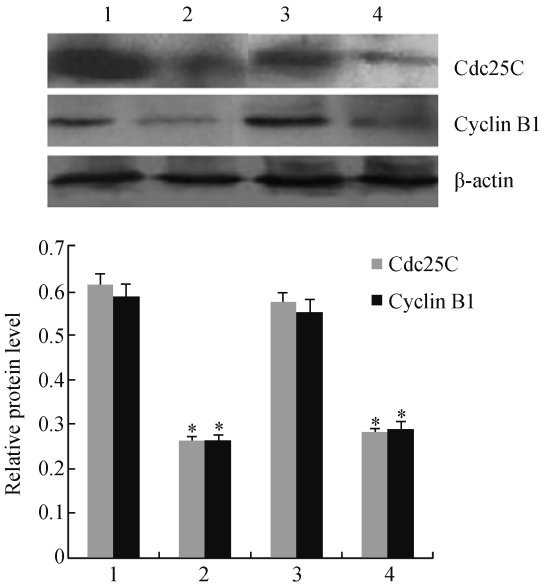

图 4 Chk2 沉默对 DADS 作用 BGC823 细胞 Cdc25C 与 cyclin B1 表达的影响

1:对照组;2:DADS 组;3:si-Chk2 组;4:si-Chk2+DADS 组

与对照组比较,* $P<0.05$

肿瘤细胞 G2/M,抑制肿瘤细胞增殖。乙酰-大萼香茶菜素 B (A-mac B)可激活 Chk1/2-Cdc25C-Cdc2/cyclin B1 通路诱导 G2/M 阻滞[7]。Rabdocoestin B 通过上调 Chk1/Chk2-Cdc25C 通路,下调 Cdc2/Cyclin B1 表达,抑制 G2 的过渡,阻滞食管癌细胞 G2/M [8]。中草药广防风中分离出的 ovatodiolide 可激活 DNA 损伤的相关分子 ATM/ATR 和 CHK1/CHK2,下调 Cyclin B1 和 CDC25C 阻滞肺癌细胞 G2/M [9]。Jaridonin 可显著诱导胃癌 MGC803 细胞中 G2/M 期阻滞,其机制与激活 ATM 和 Chk1/2 以及 Cdc2 和 CDK2 磷酸化失活有关[10]。二氢杨梅素通过 Chk1/Chk2/Cdc25C 通路阻滞 G2/M 与抑制肝细胞癌细胞增殖[11]。然而,DADS 阻滞 MGC803 细胞 G2/M 是通过 ATR/Chk1/CDC25C/cyclin B1 通路,作用靶点是 Chk1,与 Chk2 无关[5]。

研究证明,Chk2 在阻滞肿瘤细胞 G2/M 起着重要作用。SMYD3 缺失可以通过 ATM-Chk2/p53-Cdc25C 途径抑制胃癌细胞的迁移、侵袭和增殖,并阻断 G2/M 期[12]。硫代苯醚哒嗪酮化合物 IMB5043 通过激活 ATM/Chk2 通路阻滞 G2/M 期,诱导细胞凋亡,抑制肝癌 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭[13]。醉茄素 A 的亚型 W-2b 以剂量依赖性的方式促进肿瘤细胞 Chk2 磷酸化,阻滞 G2/M 期和上调 p21 表达[14]。curcumin 通过靶向 ATM/Chk2/p53 信号通路诱导头颈部鳞状细胞癌凋亡、阻滞细胞周期与抑制血管生成,发挥其抗肿瘤活性[15]。鬼臼素类似物 4DPG 提高 p-Chk2、Chk2 和抑制 Twist1 活性,阻滞 G2/M 期和上调 p21 表达,显著降低肿瘤生长和转移[16]。引人注目的是,大蒜提取物通过激活 ATM 和 Chk2,抑制 Cdc25C 和 Cdc2 磷酸化,下调 cyclin B1 和上调 p21WAF1,显著抑制膀胱癌细胞增殖与阻滞 G2/M 期[17]。DATS 通过 ATM-Chk2-Cdc25c-p21WAF1-Cdc2 信号通路阻滞膀胱癌 EJ 细胞 G2/M 期与抑制生长[18]。

本研究的目的是确定沉默 Chk2 在 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 发挥什么作用。结果显示,DADS 处理前后,Chk2 沉默组 G2/M 期细胞较对照组差异无显著性。Chk2 基因沉默后,CDC25C 和 CyclinB1 表达较对照组无明显差异。但是,DADS 处理 Chk2 沉默组后,CDC25C 和 CyclinB1 表达水平较对照组明显降低,而 DADS 处理对照组与 Chk2 沉默组之间差异无显著性。表明 Chk2 沉默对 BGC823 细胞 G2/M 与 CDC25C 和 CyclinB1 表达无影响,而且对 DADS 作用也没有影响。

综上所述,Chk2 沉默对人胃癌 BGC823 细胞 G2/M 阻滞与 DADS 作用没有影响,DADS 阻滞 G2/M 的检查点不是 Chk2。但是,大蒜提取物与 DATS 可通过 ATM-Chk2-Cdc25c 通路阻滞膀胱癌细胞 G2/M,而 Chk2 沉默却对 DADS 阻滞 BGC823 细胞 G2/M 与 CDC25C 和 CyclinB1 表达无影响,这是否是由于作用的肿瘤细胞不同或 DADS 有机硫化合物的作用机制不同,阐明这个问题尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] VISCONTI R, DELLA MONICA R, GRIECO D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 153.

[2] YI L, SU Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 57:362-70.

[3] YUAN JP, WANG GH, LING H, et al. Diallyl disulfide-induced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18):2731-4.

[4] LING H, ZHANG LY, SU Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803 [J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(3): 408-23.

[5] 夏红, 向姝霖, 曾颖, 等. DADS 对 Chk1/2 基因高表达人胃癌 MGC803 细胞 G2/M 期的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(2):199-204.

[6] LING H, WEN L, JI XX, et al. Growth inhibitory effect and Chk1-dependent signaling involved in G2/M arrest on human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide [J]. Braz J Med Biol Res, 2010, 43(3): 271-8.

[7] WANG JN, ZHANG ZR, CHE Y, et al. Acetyl-macrocalin B, an ent-kaurane diterpenoid, initiates apoptosis through the ROS-p38-caspase 9-dependent pathway and induces G2/M phase arrest via the Chk1/2-Cdc25C-Cdc2/cyclin B axis in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2018:1-27.

[8] WANG J, ZHANG Z, CHE Y, et al. Rabdocoestin B exhibits antitumor activity by inducing G2/M phase arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2018, 81(3):469-81.

[9] YU CY, JERRY TENG CL, HUNG PS, et al. Ovatodiolide isolated from Anisomeles indica induces cell cycle G2/M arrest and apoptosis via a ROS-dependent ATM/ATR signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 819:16-29.

[10] MA YC, SU N, ZHAO NM, et al. Jaridonin, a new diterpenoid from Isodon rubescens, induces cell cycle arrest in gastric cancer cells through activating ataxia telangiectasia mutated kinase [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2016, 38(4):258-62.

[11] HUANG H, HU M, ZHAO R, et al. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway [J]. Oncol Rep, 2013, 30(5):2467-75.

[12] WANG L, WANG QT, LIU YP, et al. ATM Signaling pathway is implicated in the SMYD3-mediated proliferation and migration of gastric cancer cells [J]. J Gastric Cancer, 2017, 17(4): 295-305.

[13] GONG J, ZHENG Y, WANG Y, et al. A new compound of thiophenylated pyridazinone IMB5043 showing potent antitumor efficacy through ATM-Chk2 pathway [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191984.

[14] RASOOL F, NAYAK D, KATOCH A, et al. Regiospecific synthesis of ring a fused withaferin a isoxazoline analogues: induction of premature senescence by W-2b in proliferating cancer cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):13749.

[15] XU WH, ZHENG HL. Curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo through ATM/Chk2/p53-dependent pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(31):50747-60.

[16] NAYAK D, KUMAR A, CHAKRABORTY S, et al. Inhibition of Twist1-mediated invasion by Chk2 promotes premature senescence in p53-defective cancer cells [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(7): 1275-87.

[17] SHIN SS, SONG JH, HWANG B, et al. HSPA6 augments garlic extract-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; Implication for cell cycle dysregulation, signaling pathway alteration, and transcription factor-associated MMP-9 regulation [J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0171860.

[18] SHIN SS, SONG JH, HWANG B, et al. Angiopoietin-like protein 4 potentiates DATS-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; involvement of G2/M-phase cell cycle arrest, signaling pathways, and transcription factors-mediated MMP-9 expression [J]. Food Nutr Res, 2017, 61(1):1338918.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 592 页)

[3] 李佳佳,康玲伶,马征,等. 丹参注射液联合阿司匹林对急性脑梗死患者血清炎性因子水平的影响研究[J]. 川北医学院学报,2018,33(2):173-6.

[4] 连丽霞,张佩兰,罗玉福,等. 比较静脉溶栓与双抗治疗脑梗死后 PLT、凝血指标、D-二聚体变化[J]. 中风与神经疾病, 2017, 34(1): 56-58.

[5] 王利,吴常征,卞光荣,等. 阿司匹林联合氯吡格雷治疗脑梗死的临床疗效[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2017(s1): 76-77.

[6] 许彦锋. 氯吡格雷联合阿司匹林用于急性进展性脑梗死疗效观察[J]. 河北医药, 2017(24): 3723-5.

[7] 章以杰,郭丹丹,夏连春,等. 强化降脂治疗对急性脑梗死患者血清 mTOR 和 Tau 蛋白水平的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018,35(6):908-11.

[8] 吴松,王大明,金肇权. 急性脑梗死患者血清 C 反应蛋白/脂联素和 T 细胞亚群与临床预后及神经功能的关系[J]. 东南大学学报(医学版),2018,37(1):101-6.

[9] 姜楠,翟正平,孙军山,等.阿司匹林联合氯吡格雷治疗急性脑梗死的疗效分析[J].实用临床医药杂志,2013,17(24):106-7.

[10] 陶蕾,纪立伟,王艳春. 他汀类药物对动脉粥样硬化的疗效研究[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(14):93-8.

[11] 彭敏.小剂量氯吡格雷联合阿司匹林用于 75 岁以上急性脑梗死患者的疗效及安全性评价[J].中国药业,2016,25(11): 55-7.

[12] 代允义,严鸣光,姜波,等.阿司匹林联合氯吡格雷治疗对急性脑梗死患者的影响[J].神经损伤与功能重建,2016,11(4):307-8.

[13] 吕红君,安刚,付英姿.阿昔莫司与普伐他汀联合治疗老年高脂血症的效果[J].中国老年学杂志,2016,36(7):1608-10.

[14] 徐浩,洪冰,梁海燕.氯吡格雷与阿托伐他汀联合治疗老年急性脑梗死的有效性及安全性评价[J].中国医师进修杂志, 2014,37(4):44-6.

[15] 吕建萌,潘雅娟,刘建敏,等. 阿司匹林与氯吡格雷联合治疗对急性脑梗死患者血清可溶性细胞间粘附分子-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子-α 影响研究[J]. 临床军医杂志,2017,45(10):1022-4.

(本文编辑:秦旭平)