论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.24.007

TGF-β1及Ⅰ型受体ALK1在人脑胶质瘤细胞的表达及意义*

冯九庚[1],封荣华[2],洪 涛[1△],徐 姗[3],杨玄勇[1],曾春辉[1]

(1.南昌大学第一附属医院神经外科,南昌 330006;2.江西省中医院功能诊断科,南昌 330006;3.南昌大学第一附属医院病理科,南昌 330006)

摘 要:目的 观察转化生长因子β1(TGF-β1)及活化素受体样激酶1(ALK1)在人脑胶质瘤细胞中的表达及其在胶质细胞瘤病理分级中的意义。**方法** 采用半定量RT-PCR、Western blot及免疫组织化学染色等方法检测32例人脑胶质瘤及3例正常脑组织中TGF-β1及ALK1 mRNA及蛋白的表达水平。**结果** 人脑胶质瘤细胞中存在TGF-β1及ALK1 mRNA和蛋白表达。与正常组比较,高级别胶质瘤组TGF-β1及ALK1 mRNA和蛋白表达均显著升高($P<0.05$),其中ALK1的高表达与胶质瘤病理级别呈明显正相关($r=0.297,P<0.05$)。**结论** 人脑胶质细胞瘤中,ALK1可能参与了胶质瘤的恶变过程。

关键词:转化生长因子β1;活化素受体样激酶1;脑胶质瘤

中图分类号:R651.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2014)24-3139-04

Expression and significance of TGF-β1 and its type I receptor ALK1 in human brain glioma*

Feng Jiugeng[1], *Feng Ronghua*[2], *Hong Tao*[1△], *Xu Shan*[3], *Yang Xuanyong*[1], *Zeng Chunhui*[1]

(1. *Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*; 2. *Department of Diagnostic Function, Traditional Chinese Medical Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*; 3. *Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*)

Abstract:Objective To study the expression of transforming growth factor beta1(TGF-β1)and its type I receptors activin-like kinase 1(ALK1) in the human brain glioma and estimate the significance in the pathogenisis and development of human glioma. **Methods** The mRNA and protein expressions of TGF-β1 and ALK1 were detected with semiquantitative RT-PCR, Western blot and Immunohistochemistry in 3 normal brain tissues and 32 patiens with human glioma. **Results** ALK1 and TGF-β1 mRNA and protein sometimes had co-expression in human gliomas tissues. Compared with those normal brain tissues, the expression of TGF-β1 and ALK1 mRNA and protein in high grade gliomas were significantly increased($P<0.05$), the overexpression of ALK1 in human gliomas was demonstrated significant positive correlation with the pathological grades of gliomas($r=0.297,P<0.05$). **Conclusion** The overexpression of ALK1 may play important role in the development of human brain glioma.

Key words: transforming growth factor beta1; activin-like kinase 1; human brain glioma

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,约占颅内肿瘤的40%～50%,其治疗仍是当今世界的一大难题。转化生长因子β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)是多种组织细胞的生长抑制调控因子,其与不同型受体结合后对细胞生长起调节作用,但其在胶质瘤中的作用机制尚未完全明确。本课题拟探讨活化素受体样激酶1(activin receptor-like kinase 1,ALK1)及TGF-β1在人脑胶质瘤细胞中的表达水平及其在胶质细胞瘤病理分级中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集南昌大学第一附属医院神经外科2011年6月至2012年9月手术切除的胶质细胞瘤新鲜标本32例,其中,男14例,女18例;年龄31～56岁,平均43.5岁;所有病例均按Kernohan分级进行分组,均经病理学检查证实诊断,其中Ⅰ级组6例,均为毛细胞性星形细胞瘤;Ⅱ级组8例,其中弥漫性星形细胞瘤5例,包括纤维性、原浆性、肥胖性星形细胞瘤,少枝胶质瘤3例;Ⅲ级组8例,其中间变性星形细胞瘤4例,间变性少枝胶质瘤2例,间变性少枝星形细胞瘤2例;Ⅳ级组10例,其中胶质母细胞瘤6例,髓母细胞瘤4例。由于正常脑组织标本难以获取,3份正常组均取自脑外伤内减压术患者标本。

1.2 主要仪器及试剂 鼠抗人TGF-β1单克隆抗体(sc-130348)、兔抗人ALK1抗体(sc-28976)、HRP标记羊抗兔IgG抗体(Santa Cruz公司)。SP试剂盒,DAB二氨基联苯显色剂试剂盒,PBS液等均购自福州迈新生物技术有限公司。M-MLV反转录试剂盒(Promega公司)。Trizol试剂为美国Gibco BRL产品。仪器包括Olympus显微镜、Syngene GeneTools凝胶成像系统、微波炉等。ALK1、TGF-β1和β-actin等引物均由上海博亚生物公司合成。

1.3 RNA的提取及半定量RT-PCR 脑胶质瘤标本组织无菌条件下保存于液氮罐冻存管中,无菌匀浆器匀浆后沉淀中加入Trizol试剂,根据试剂说明提取总RNA于－70 ℃贮存备用,行半定量RT-PCR分析。按照Promega公司的M-MLV反转录酶操作说明书进行,反转录体系在37 ℃孵育1 h。β-actin、TGF-β1和ALK1的PCR引物分别为β-actin上游引物:5′-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3′,下游引物:5′-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3′,扩增产物为308 bp;TGF-β1上游引物:5′-AGG TCA CCC GCG TGC TAA T-3′,下游引物:5′-TCA ACC ACT GCC GCA CAA CT-3′,扩增产

* **基金项目:**江西省卫生厅科技计划项目(20111037);国家自然科学基金资助项目(81060099)。 **作者简介:**冯九庚(1979－),硕士,副主任医师,主要从事脑血管疾病、脑胶质瘤等基础及临床研究。 △ **通讯作者**,Tel:13803535961;E-mail:ht2000@vip.sina.com。

物为 309 bp；ALK1 上游引物：5′-AGC CGC AAT GTG CTG GTC AA-3′，下游引物：5′-AGT CCT CCA CGA TGC CAT TC-3′，扩增产物为 264 bp；PCR 扩增条件：95 ℃cDNA 退火 65 s；53 ℃引物退火 55 s；72 ℃引物延伸 45 s，总共 30 个循环，循环终止后 72 ℃终延伸 5 min。PCR 产物用 2%琼脂糖电泳溴化乙锭显色，DNA 片断在 Syngene GeneTools 下扫描分析，取 TGF-β1 及 ALK1/β-actin 灰度比值作为各组胶质细胞瘤标本及正常对照中 TGF-β1 及 ALK1 mRNA 平均相对含量，记录结果，以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

1.4 总蛋白的提取及 Western blot 检测　手术切除的新鲜脑胶质瘤标本组织无菌条件下保存于液氮罐冻存管中，每组分别称取 100 mg 组织，用冷 PBS 漂洗 3 次。加入 200 μL 细胞裂解液，冰上匀浆后裂解 30 min。按照蛋白裂解抽提试剂盒进行提取胶质瘤总蛋白并样品蛋白含量的测定，配制 5%积层胶及 8%分离胶进行灌胶上样，每组各取 30 μg 蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），电泳后将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维膜，5%脱脂奶粉 PTST 室温封闭 1 h。硝酸纤维膜与一抗（TGF-β1，ALK1）4 ℃孵育过夜，PTST 漂洗 4×10 min。再与辣根过氧化物酶标记二抗 37 ℃孵育 1 h 行化学发光及曝光，显色后用 Syngene GeneTools 系统扫描半定量分析显影条带，对结果进行图像分析，TGF-β1、ALK1 蛋白表达量=（目的蛋白电泳条带灰度值/GAPDH 条带灰度值）×100%。

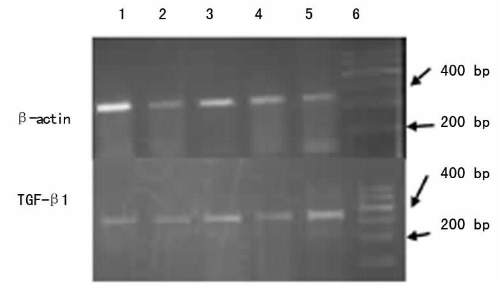
1.5 免疫组织化学染色检测 ALK1、TGF-β1　按照免疫组织化学 SP 试剂盒（福建迈新公司）步骤，各组标本予脱蜡、甲醛固定及内源性过氧化物酶及血清封闭后在玻片上滴加鼠抗人 TGF-β1 单克隆抗体及兔抗人 ALK1 抗体染色并二抗和链亲和素一过氧化物（SA/HRP）标记，DAB 显色至微黄，苏木素复染后中性树胶封片。同时做用 PBS 代替一抗的阴性对照。高倍视野（×400）下见胞质内有棕黄色或褐色颗粒为染色阳性细胞。采用双盲法观察 5～10 个视野，计数 500 个细胞，计算高倍视野下 100 个细胞中阳性细胞数。阳性细胞率小于或等于 10%为阴性，大于 10%为阳性。

1.6 统计学处理　数据输入 SPSS13.0 统计软件，所有实验组均进行方差齐性分析，均数比较采用两样本 t 检验，采用 Spearman 非参数相关检验做相关分析。

2 结　　果

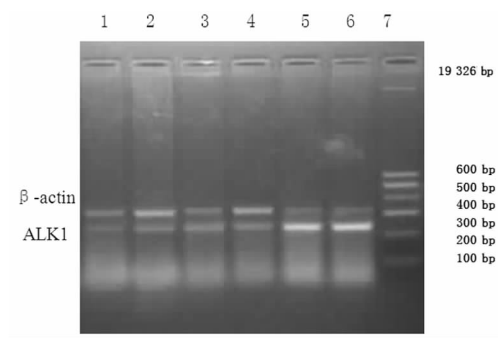
2.1 TGF-β1 及 ALK1 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果（图 1～2）　将提取的总 RNA 与目的基因和内参照基因的引物进行逆转录和 PCR 扩增，扩增产物与 PCR Marker 电泳，结果通过计算机灰度扫描并与内参照（β-actin）比较出半定量 RT-PCR 相对表达含量。与正常组灰度比（0.730±0.089）相比，脑胶质瘤Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级组 TGF-β1 灰度比升高，分别为 0.747±0.078、0.751±0.092、0.760±0.084，差异无统计学意义（$P>0.05$）；脑胶质瘤Ⅳ级组灰度比为 0.847±0.078，差异有统计学意义（$P<0.05$）。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ级组Ⅰ型受体 ALK1 相对表达量分别为 0.783±0.064、0.827±0.081、0.983±0.076 及 1.683±0.065，与正常对照组（0.635±0.089）比较，差异有显著统计学意义（$P<0.01$）。

2.2 TGF-β1、ALK1 蛋白表达的 Western blot 检测结果（图 3）　通过 Western blot 检测各组脑胶质瘤标本 TGF-β1、ALK1 蛋白表达显示，TGF-β1 在正常组及Ⅰ级组表达低下，而Ⅱ、Ⅲ级和Ⅳ级组 TGF-β1 表达明显升高，与正常组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；另各组脑胶质瘤标本中 ALK1 蛋白表达明显升高（$P<0.05$），Spearman 秩相关分析显示各蛋白表达均与肿瘤病理分级呈正相关（$r=0.297$，$P<0.05$）。



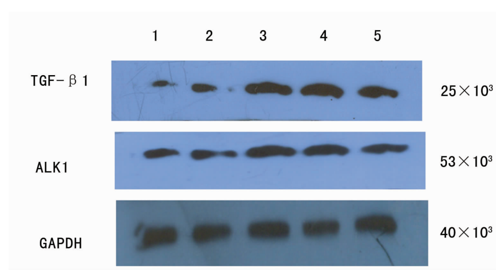
1：正常对照组；2：脑胶质瘤Ⅰ级组；3：脑胶质瘤Ⅱ级组；4：脑胶质瘤Ⅲ级组；5：脑胶质瘤Ⅳ级组；6：PCR Marker。

图 1　半定量 RT-PCR 检测 TGF-β1 在各组标本中的表达水平



1：正常对照组；2：脑胶质瘤Ⅰ级组；3：脑胶质瘤Ⅱ级组；4：脑胶质瘤Ⅲ级组；5～6：脑胶质瘤Ⅳ级组；7：PCR Marker。

图 2　半定量 RT-PCR 检测 ALK1 在各组中的表达水平



1：正常对照组；2：脑胶质瘤Ⅰ级组；3：脑胶质瘤Ⅱ级组；4：脑胶质瘤Ⅲ级组；5：脑胶质瘤Ⅳ级组。

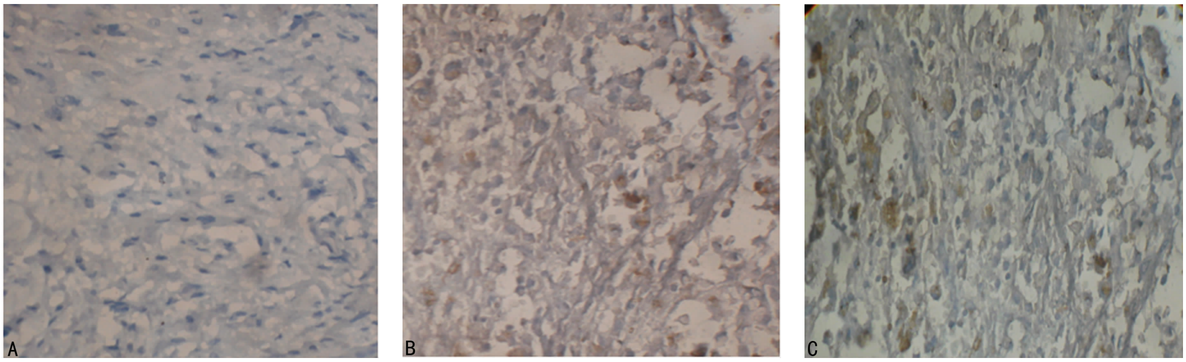
图 3　Western blot 检测 ALK1 蛋白在各组中的表达水平

表 1　正常脑组织及胶质瘤组织 TGF-β1、ALK1 表达水平比较

组织标本	n	阳性率	
		TGF-β1	ALK1
Ⅰ级	6	33.3%(2/6)	50%(3/6)
Ⅱ级	8	37.5%(3/8)	62.5%(5/8)
Ⅲ级	8	62.5%(5/8)	75%(7/8)
Ⅳ级	10	80%(8/10)	90%(9/10)
正常脑组织	3	0%(0/3)	33.3%(1/3)

2.3 免疫组织化学染色法（表 1，图 4）　正常组及胶质瘤组 TGF-β1、ALK1 阳性率见表 1。由表 1 可见，正常组几乎不存在 TGF-β1 表达，但有 ALK1 表达，低级别组（Ⅰ～Ⅱ级）TGF-β1 表达处于低水平，高级别组（Ⅲ～Ⅳ级）胶质瘤组织表达明

显升高($P<0.05$),其阳性率分别为 62.5%(5/8)、80%(8/10)。发现不同级别胶质瘤组均存在胞质内有棕黄色或褐色颗粒 ALK1 染色阳性细胞而对照组少见染色阳性细胞。与对照组比较,各级别组 ALK1 阳性细胞百分率差异有统计学意义($P<0.05$)。



A:正常对照组;B:TGF-β1 阳性表达;C:ALK1 阳性表达。

图 4　免疫组化染色(×400)

3　讨　论

转化生长因子是一种具有多功能的生长因子,属于一组调节细胞生长和分化的 TGF-β 超家族,有着重要的病理及生理功能。TGF-β1 是 TGF-β 超家族中多种组织细胞的生长调控因子之一,其对肿瘤的负性调节作用得到大量文献证实。TGF-β1 早期研究主要集中在其参与炎症、组织修复方面,近期发现其与细胞分化、生长与发育,尤其是控制细胞增殖及迁徙、血管生成及肿瘤免疫等密切相关。TGF-β1 在脑胶质瘤中的研究结果比较复杂,其作用机制尚未明确,国内外对其表达量与胶质瘤的恶性程度相关性有不同的报道。Yamanaka 等[1]认为 TGF-β1 在绝大多数恶性胶质瘤中都有分泌,而且 TGF-β1 的活性形式是 TGF-β2 的 10 倍。Stiles 等[2]使用免疫组织化学方法研究 TGF-β1 在胶质瘤内的表达,认为与其恶性度有关。文献[3-4]通过用免疫组织化学方法检测了胶质瘤,认为 TGF-β1 的表达与胶质瘤的分级呈正相关。另外,有研究发现[5-6]在恶性胶质瘤患者的血清中也检测到 TGF-β1 的升高,认为这种升高与患者肿瘤分级、进展、肿瘤患者预后密切相关,可能是胶质瘤治疗的靶点。而 Samuels 等[7]在 17 例胶质瘤免疫组织化学检测显示 TGF-β1 蛋白表达与肿瘤的恶性级别并不相关。Merzak 等[8]研究发现 TGF-β1 对胎儿脑细胞和胶质瘤细胞株均有抑制作用,但与胶质瘤恶性程度无关。本实验中通过检测不同级别胶质瘤组织中 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达发现正常处于低水平的 TGF-β1 蛋白表达出现升高,高级别胶质瘤显著升高并与低分级胶质瘤比较差异有统计学意义,与文献报道一致,但研究发现 TGF-β1 在 mRNA 水平无此现象,考虑是否从 mRNA 翻译成蛋白过程中受到调控,导致其与蛋白表达水平不一致,使蛋白过度表达,TGF-β1 功能上调,其机制需进一步探讨。

TGF-β 在细胞中一般以无活性形式合成与分泌,其生物学作用是由细胞膜上的特异受体介导的,不仅 TGF-β 而且其受体在调节细胞中起重要作用。体外研究发现多种肿瘤(例如肠道癌、肝癌、肺癌、前列腺癌)等都存在 TGF-β1 的高表达,并可抑制细胞的增殖,在体内许多肿瘤细胞却对 TGF-β1 介导的生长抑制无明显应答,而存在促进肿瘤生长的可能,考虑 TGF-β1 作用可能存在双重性或多重性[9-10]。文献推测胶质瘤的发生、发展及恶性胶质瘤的高侵袭性可能与 TGF-β 的受体表达异常或介导的信号通路有关[11]。许多细胞表面都有 TGF-β 受体,研究发现哺乳动物 TGF-β 受体主要存在着Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型 3 种形式,相对分子质量分别为 53×10^3、$(70\sim85)\times10^3$ 和 $(250\sim350)\times10^3$。Ⅰ、Ⅱ型 TGF-β R 均为糖蛋白,是跨膜的丝氨酸苏氨酸激酶,具有蛋白酶活性。有文献表明其与 TGF-β1 的亲和力要比和 TGF-β2 的亲和力大 10～80 倍,是 TGF-β1 主要受体。Ⅲ型 TGF-β 受体本身缺乏活性,对于其如何参与信号的传递尚不清楚。ALK1 是 TGF-β1 家族蛋白中的Ⅰ型受体,是 7 个 TGF-β1 的Ⅰ型受体中的一个,通过介导 TGF-β1 参与多条信号通路调节细胞增殖、分化和凋亡等众多生物学过程。有研究表明采用基因打靶技术灭活鼠 ALK1 基因,ALK1 纯合子胚胎死在中孕期,表现为严重的血管异常,例如人 ALK1 基因突变可直接导致遗传性出血性毛细血管扩张症[12]。另发现当血管发生早期缺乏 ALK1 会导致动静脉之间形成分流,而管床形成的过程中 ALK1 也是必需的[13],提示其在动静脉形成的过程中,无论在结构、功能以及分子特征上均具有重要的作用。Cunha 等[14]对血管细胞表面一种 ALK1 受体进行研究,当阻断老鼠肿瘤中的 ALK1 受体时,发现血管再生受到抑制,肿瘤停止生长,认为 ALK1 可能是肿瘤治疗新靶标。研究发现 ALK5 抑制增殖、网络形成和管状血管形成以及诱导细胞凋亡,而 ALK1 在内皮细胞,它与 TGF-β1 结合,通过下游信号分子 Smad 2/3 拮抗 ALK5 信号通道的作用[15-16],导致内皮细胞的增殖和迁移,两种Ⅰ型受体对 TGF-β1 的调节作用是相反的。因此,推测 ALK1-TGF-β1-ALK5 之间平衡与否是血管生成异常的根本原因[17]。目前认为 TGF-β1 促血管生成主要是其通过调控内皮细胞的基因增加胶原蛋白的形成和聚集,因而参与血管内皮细胞的出芽和管腔形成,同时可使内皮形成广泛的分支管状结构,促进了肿瘤组织血管的生成。肿瘤生长和浸润的关键是肿瘤血管的发生,新生血管提供肿瘤细胞营养和养分,肿瘤细胞通过内渗至血液系统,导致肿瘤转移,这也是目前抗肿瘤药物作用的重要靶点。本实验通过检测Ⅰ型受体 ALK1 mRNA 蛋白等发现随着胶质瘤病理分级的升高,其 ALK1 mRNA 蛋白表达明显升高并与胶质瘤的病理分级具有正相关性,可能是体内Ⅰ型受体 ALK1 的高表达介导 TGF-β1 信号通路。本研究发现高级别胶质瘤中 ALK1 及 TGF-β1 呈高表达状态,其是否参与了肿瘤恶变过程、是否与肿瘤侵袭性相关等具体机制值得深入研究,以期为临床诊治提供新靶点和方法。

参考文献：

[1] Yamanaka R, Tanaka R, Yoshhida S, et al. Suppression of TGF-β1 in human gliomas by retroviral gene transfection enhances suscepibility to LAK cells[J]. J Neurooncol, 1999, 43(1): 27-34.

[2] Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, et al. Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor-β1 with malignancy and vascularity in human gliomas[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56(4): 435-439.

[3] Yamada N, Kato M, Yamashita H, et al. Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-Ⅰ and type-Ⅱ receptors in human glioblastoma[J]. Int J Cancer, 1995, 62(5): 386-392.

[4] 陈谦学，黄乔春，郑虎，等. 脑胶质瘤 TGF-β1 和 bFGF 与增殖活性的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志，2005，15(2)：227-229.

[5] Rich JN. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors[J]. Front Biosci, 2003, 8: e245-260.

[6] Joseph JV, Balasubramaniyan V, Walenkamp A, et al. TGF-β as a therapeutic target in high grade gliomas-promises and challenges[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(4): 478-485.

[7] Samuels V, Barrett JM, Bockman S, et al. Immunocytochemical study of transforming growth factor expression in begin and malignant gliomas[J]. Am J PaLhol, 1989, 134(4): 895-902.

[8] Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, et al. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor-β1[J]. Br J Cancer, 1994, 70(2): 199-203.

[9] 冯传波，夏春咸，何治军，等. TGF-β1、TβRⅡ及 P38 蛋白在胃癌发生发展中的意义[J]. 重庆医学，2010，39(12)：1511-1513，1634.

[10] 袁鹏，陈建江，方波，等. VEGF、bFGF、TGF-β1 和 TAF 在胶质瘤中的表达意义及其与血管生成的关系[J]. 重庆医学，2004，33(1)：63-64.

[11] 蔡望青，陈由芝，李海刚. 转化生长因子 β 及其Ⅱ受体在胶质瘤中的表达[J]. 癌症，1999，33(5)：554-556.

[12] 王海茹，张桂茹，王晓明，等. 遗传性出血性毛细血管扩张症一家系 ALK-1 基因突变检测[J]. 吉林大学学报：医学版，2006，32(3)：511-514.

[13] Lisa D, Urness BA, Lise K, et al. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1[J]. Nat Genet, 2000, 26(11): 328-332.

[14] Cunha SI, Pardali E, Thorikay M, et al. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis[J]. J Exp Med, 2010, 207(1): 85-100.

[15] Paul S, Seki T, Goss KA, et al. Activin Receptor-like-Kinase(ALK) 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis[J]. Pro Nat Acad Sci USA, 2000, 97(6): 2626-2631.

[16] Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-β responses[J]. Cell, 1998, 95(6): 737-740.

[17] 李斌，唐仕波，林少芬，等. ALK-1-TGF-β-ALK-5：平衡与混沌[J]. 广州医药，2005，36(3)：1-4.

（收稿日期：2014-02-03 修回日期：2014-04-20）

（上接第 3138 页）

slice computed tomography[J]. Int J Cardiol, 2006, 109(2): 188-194.

[6] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et, al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease. Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease. Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association[J]. Circulation, 1975, 51(Suppl 4): 5-40.

[7] 段青，薛蘊箐. 多层螺旋 CT 在冠状动脉支架术的应用[J]. 心血管康复医学杂志，2003，12(5)：389-390.

[8] Alfonso F, Zueco J, Cequier A, et al. Arandomized comparison of repeat stenting with balloon angioplasty in patients with in-stent restenosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(5): 796-805.

[9] Zahn R, Hamm CW, Schneider S, et al. Incidence and predictor of target vessel revascularization and clinical event rates of the sirolmuseluting coronary stent[J]. Am J Cardiol, 2005, 95(11): 1302-1308.

[10] Hill MN. New targeted AHA program: cardiovascular care and outcomes[J]. Circulation, 1999, 97(15): 1221-1222.

[11] De Bono D. Complications of diagnostic cardiac catheterization: results from 34041 patients in the United Kingdom confidential enquiry into cardiac catheter complications. The Joint Audit Committee of the British Cardiac Society and Royal College of Physicians of London[J]. Br Heart J, 1993, 70(5): 297-300.

[12] 唐陶富. 多层螺旋 CT 冠脉成像在冠心病诊断中的临床应用进展[J]. 中国医疗前沿，2009，4(20)：14-16.

[13] Kruger S, Mahnken AH, Sinha AM, et al. Multislice spiral computed tomography for the detection of coronary stent restenosis and patency[J]. Int J Cardiol, 2003, 89(2): 167-172.

[14] Oncel D, Oncel G, Karaca M. Coronary stent patency and in-stent restenosis: determination with 64-section multidetector CT coronary angiography-initial experience[J]. Radiology, 2007, 242(2): 403-409.

[15] Juwana YB, Wirianta J, Suryapranata H, et al. Left main coronary artery stenosis undetected by 64-slice computed tomography: a word of caution[J]. Neth Heart J, 2007, 15(7-8): 255-256.

（收稿日期：2014-01-27 修回日期：2014-04-20）