

重复温热刺激对脂多糖作用后人脐静脉内皮细胞的细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 的影响

吴雨蕊¹ 王红¹ 张若凡¹ 杨森¹ 张建斌² 姜劲峰¹

¹南京中医药大学针药结合教育部重点实验室,南京 210023; ²南京中医药大学第二临床医学院,江苏省第二中医院,南京 210017

通信作者:姜劲峰,Email: dr.acujf@njucm.edu.cn

【摘要】 目的 观察重复温热刺激对炎症状态下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)状态及其功能的影响。**方法** 将培养好的 HUVECs 分成空白组、模型组、温热刺激 5 次组(5 次组)、温热刺激 9 次组(9 次组)和温热刺激 13 次组(13 次组),分别接种至五个相同培养条件的培养皿中。空白组为正常 HUVECs,不予任何刺激;模型组加入脂多糖(LPS)作为炎症状态模型对照;5 次组、9 次组和 13 次组均先进行重复温热刺激,将恒温箱调至 43 ℃,将 5 次组、9 次组和 13 次组放入其中,持续温热刺激 4 min 后取出,置于自然环境静置 1 min 后进行重复温热刺激,3 组均接受对应次数的温热刺激。5 组 HUVECs(空白组入组后即刻,模型组、5 次组、9 次组和 13 次组均于加入 LPS 后置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养 1 h)均采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞活力,免疫荧光检测核因子-κB(NF-κB)的表达,酶联免疫吸附剂测定 ELISA 法检测 5 组 HUVECs 黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 的水平。**结果** 干预后,模型组、5 次组和 13 次组细胞活力的 OD 值显著低于空白组,差异均有统计学意义($P<0.05$),9 次组细胞活力的 OD 值明显高于模型组、5 次组和 13 次组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预后,模型组、5 次组、9 次组和 13 次组的 NF-κB 表达量与空白组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预后,9 次组 NF-κB 表达与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。干预后,模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 的 OD 值显著增加,5 次组、9 次组和 13 次组 ICAM-1 和 VCAM-1 的 OD 值却显著下降,与空白组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);5 次组、9 次组、13 次组的 ICAM-1 和 VCAM-1 的 OD 值与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预后,9 次组 ICAM-1 的 OD 值为(43.00±12.96),与 5 次组的(205.89±10.56)和 13 次组的(109.87±8.86)比较,差异亦均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 重复温热刺激既可以保护炎症状态下 HUVECs,也可降低炎症状态下 HUVECs 的黏附分子的表达。

【关键词】 人脐静脉内皮细胞; 温热刺激; 炎症状态; 细胞活力

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81973947)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.10.003

The effect of repeated thermal stimulation on the viability and functioning of inflamed endothelial cells in the umbilicus

Wu Yurui¹, Wang Hong¹, Zhang Ruofan¹, Yang Sen¹, Zhang Jianbin², Jiang Jingfeng¹

¹Key Lab of Combined Acupuncture and Medication Education, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ²The Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, The Second Hospital of Traditional Chinese Medicine of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China

Corresponding author: Jiang Jingfeng, Email: dr.acujf@njucm.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine any effect of repeated thermal stimulation on the viability and functioning of inflamed human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** Well-cultured HUVECs were divided into a normal group, a model group, a thermal stimulation 5 times group (group A), a thermal stimulation 9 times group (group B) and a thermal stimulation 13 times group (group C) and cultured under the same conditions. The normal group was not given any intervention. The model group was stimulated with 1 μg/mL lipopolysaccharide for 1 hour. Groups A, B and C were first subjected to 5, 9 and 13 rounds of repeated thermal stimulation, each round lasting 4 minutes at 43℃ and 1 minute at room temperature. They were then incubated for one hour at 37℃ under a 5% CO₂ atmosphere with 1 μg/mL lipopolysaccharide. Cell viability and the expression of NF-κB were evaluated using methyl thiazolyl tetrazolium and immunofluorescence assays. The levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and

vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** After the intervention, the average cell viability of the model group and of groups A and C was significantly lower than that of the normal group, while that of group B was significantly higher. After the intervention, the average NF- κ B expression in the normal group was significantly different from that in the others, with group B's level significantly different from that of the model group. After the treatment, the average expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the model group had increased significantly, while that in groups A, B and C had decreased significantly compared with the normal group. The levels of groups A, B and C were then significantly different from that of the model group. The average ICAM-1 level of group B was significantly different from those of groups A and C. **Conclusions** Repeated thermal stimulation can protect inflamed HUVECs and reduce the expression of HUVEC adhesion molecules.

【Key words】 Umbilical cells; Vein endothelial cells; Thermal stimulation; Inflammation; Cell viability

Funding: The National Natural Science Foundation of China (81973947)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.10.003

神阙即肚脐,是腹部微循环最为丰富的穴位,而脐静脉在出生后会退化成为肝圆韧带,肝圆韧带内具有完整的内皮细胞层^[1-2]。有研究提出,内皮细胞(微血管内皮细胞)反映的是血管生物学(脉管)效应的基础,其丰富的微循环组织构成也是中医取穴神阙用于治疗疾病的机制所在^[3]。现代医学研究发现,内皮细胞在炎症过程中具有核心地位^[4],且炎症部位的微血管内皮细胞是炎症过程的积极参与者和调节者^[5]。目前,鲜见温灸对于炎症状态下内皮细胞功能影响的研究,本研究旨在观察重复温热刺激脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用于体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)对 HUVECs 的细胞活力和核因子- κ B(nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B)水平的影响,及其对炎症过程中,内皮细胞对白细胞从血管内迁移到炎症部位的细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1)水平的影响,以明确重复温热刺激对炎症状态下内皮细胞的状态及其功能的影响。

材料与方法

一、实验材料

HUVECs 由上海传秋生物有限公司购置,货号 CQ80252 型。

二、主要试剂与仪器

1. 研究试剂: Dulbecco's 高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;四甲基偶氮唑盐(4,5-dimethylthiazoyl-zyl2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和 LPS 购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国 Corning 公司;辣根过氧化物酶偶山羊抗兔 IgG(H+L), (HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) Antibody)购自上海 Abways

公司; DAPI 染色液[2-(4-Amidinophenyl)-6-indole-carbamidine dihydrochloride, DAPI dihydrochloride]购自上海碧云天 Beyotime 生物技术有限公司。

2. 研究仪器:二氧化碳培养箱(ROC-3000TVBB 型,美国 REVCO 公司);生物超净工作台(BCM-1000A 型,江苏苏净集团安泰公司);台式高速离心机(CT14D 型,上海天美生化仪器工程有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(GZX-9146MBE 型,上海博迅实业有限公司医疗设厂)。

三、HUVECs 培养和分组方法

将 HUVECs 接种至含有完全培养液的培养皿中,置于条件为 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养;每 2 d 换液 1 次;用显微镜密切观察 HUVECs 生长情况。传代:在显微镜下观察细胞长满 80%至 90%时方可传代。用移液器移去培养液,加入 0.25%胰蛋白酶进行消化,待多数细胞脱壁后,在培养皿中加入完全培养液以终止消化,1 000r/min 离心 5 min,以 1:2 传代。

将培养好的 HUVECs 分成空白组、模型组、温热刺激 5 次组(5 次组)、温热刺激 9 次组(9 次组)和温热刺激 13 次组(13 次组),分别接种至五个相同培养条件的培养皿中。

四、干预方法

空白组为正常 HUVECs,不予任何刺激;模型组加入 LPS 作为炎症状态模型对照;5 次组、9 次组和 13 次组均先进行对应次数的重复温热刺激,然后加入 LPS。

温热刺激方式^[6]:先将恒温箱调至 43℃,待恒温箱温度稳定后将 5 次组、9 次组和 13 次组放入其中,持续温热刺激 4 min,从恒温箱取出,然后置于自然环境静置 1 min,分别进行对应次数的温热刺激(即 5 次组行温热刺激 5 次,9 次组行温热刺激 9 次,13 次组行温热刺激 13 次)。5 次组、9 次组和 13 次组均于重复温热刺激结束后,加入 LPS(1 μg/mL),静置 5 min。

五、检测方法

空白组入组后即刻进行各项检测,模型组、5 次

组、9 次组和 13 次组均于加入 LPS,并置于 37 ℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养 1 h 后进行各项检测。

1. HUVECs 生长活力的测定:采用 MTT 法用于检测 HUVECs 的生长活力,将 5 组 HUVECs 接种于 MTT 专用 96 孔培养板中,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)填充边缘无细胞孔,然后置于 37 ℃、5% CO₂ 培养中培养 72 h 后,采用酶标仪 450 nm 测定并记录 5 组 HUVECs 的光密度(optical density, OD)值。

2. 免疫荧光检测:取 5 组 HUVECs 加入 4%多聚甲醛并固定 30 min,在孔板加入含 0.1% Triton X-100-PBS 的混合溶液,室温孵育 10 min,再加入 3% BSA-PBS,室温下封闭 30 min。用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)洗 3 次,每次 5 min 后,在孔板中加入一抗为兔抗 NF-κB p65 抗体(1:200, Abways),置于 4 ℃冰箱中孵育 12 h。用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,在暗室中加入二抗 HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:1000, 带荧光, Abways),置于摇床上,室温孵育 1 h。用 PBS 漂洗后置于荧光倒置显微镜下观察(激发波长 420 nm, 发射波长 520 nm)。在孔板中加入 1 mL 已稀释的 DAPI 染液(10 μg/mL DAPI-PBS),室温摇床上孵育 30 min 移去废液, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,置于荧光倒置显微镜下观察(激发波长 360 nm, 发射波长 460 nm)。采用 Image J 图像分析系统对所得图片进行定量分析,得出 NF-κB 核转移的荧光表达量。

3. 酶联免疫吸附剂测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA):采用 ELISA 法检测 5 组 HUVECs 黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的水平,由南京钟鼎生物技术有限公司完成,酶标仪 450 nm 下测定并记录其 OD 值。

六、统计学方法

数据均采用 SPSS 22.0 版统计软件进行分析,均进行正态性检验和方差齐性检验,若符合正态分布,用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,(least-significant difference, LSD)最小显著性差异法检验;若不符合正态分布,数据用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,采用非参数检验中的秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、不同干预组 HUVECs 细胞活力检测结果比较

干预后,模型组、5 次组和 13 次组细胞活力的 OD 值均显著低于空白组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),9 次组细胞活力的 OD 值与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但明显高于模型组、5 次组和 13 次组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1。

二、不同干预组 HUVECs 中 NF-κB 表达量结果比较

干预后,模型组、5 次组、9 次组和 13 次组的 NF-κB 表达量与空白组比较均明显上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。干预后,5 次组、9 次组和 13 次组的 NF-κB 表达均有所下降,但仅 9 次组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表 1 和图 1。

三、不同干预组 HUVECs 中 ICAM-1 和 VCAM-1 表达结果比较

干预后,模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达显著增加,5 次组、9 次组和 13 次组 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达却显著下降,4 组与空白组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);5 次组、9 次组、12 次组的 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。9 次组 ICAM-1 的表达与 5 次组和 13 次组比较,差异亦均有统计学意义($P < 0.05$),但 9 次组 VCAM-1 的表达与 5 次组和 9 次组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

讨 论

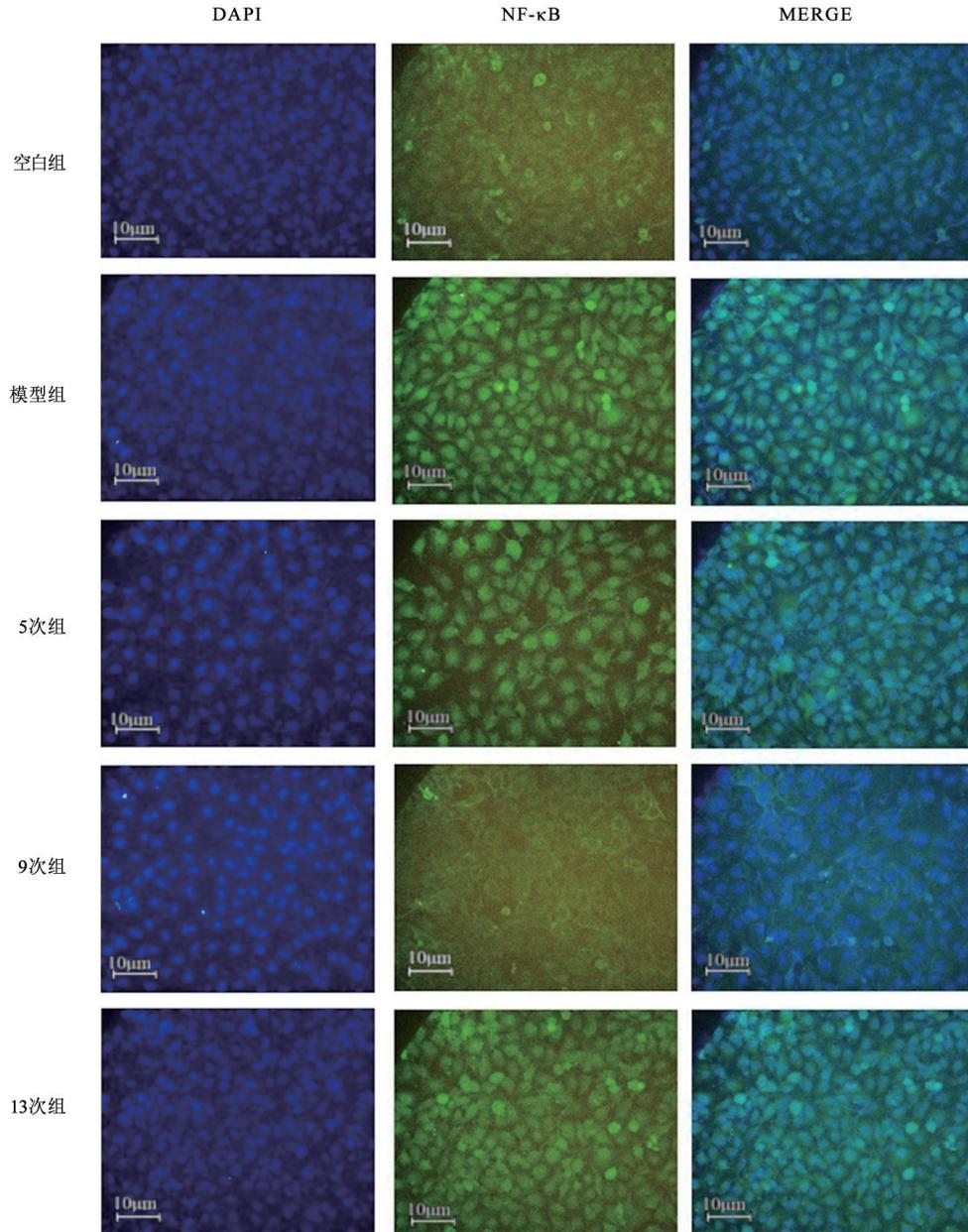
本研究结果表明,重复温热刺激既可以保护炎症状态下的 HUVECs,也可降低炎症状态下 HUVECs 的黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。

研究证明,内皮细胞参与了炎症的发生、发展和免疫^[4-5],在休克、微循环障碍、多器官功能损伤中具有重要作用;内皮细胞不仅是参与炎症应答的主要被动性靶细胞之一,而且是一种效应细胞。炎症是一种微循环的保护性反应^[3],炎症位点的微血管内皮细胞(microvascular endothelial cells, mECs)可形成特异性的微循环网络,负责免疫细胞的迁移和激活,抑制免疫细胞功能和调节免疫,导致有成效的免疫反应。mECs 识别血液中外源性病原体 and 内源性代谢物并作出反应是早期固有免疫激活程序的一部分。mECs 激活产生

表 1 5 组 HUVECs 的细胞活力、NF-κB、ICAM-1 和 VCAM-1 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力的 OD 值	NF-κB 表达量	ICAM-1 的 OD 值	VCAM-1 的 OD 值
空白组	0.20±0.02	1.32(0.21~2.36)	402.01±12.3	362.43±22.12
模型组	0.14±0.06 ^a	2.79(1.43~4.32) ^a	558.89±85.7	507.00±90.54 ^a
5 次组	0.08±0.06 ^{abc}	2.42(1.50~4.19) ^a	205.89±10.56 ^{abc}	208.62±12.97 ^{ab}
9 次组	0.19±0.04 ^b	1.45(0.66~3.33) ^{ab}	43.00±12.96 ^{ab}	182.49±58.86 ^{ab}
13 次组	0.11±0.06 ^{abc}	2.29(1.29~2.96) ^a	109.87±8.86 ^{abc}	205.63±27.25 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 9 次组比较,^c $P < 0.05$



注:蓝色荧光为细胞核,绿色荧光为 NF-κB 反应阳性的细胞,双重荧光为 NF-κB 发生核转移

图 1 5 组 HUVECs 的 NF-κB 表达的变化(×20)

广谱的致炎因子、生长因子,上调黏附分子(VCAM-1、ICAM-1 等)表达,可导致白细胞迁移至炎症位点,并诱导免疫细胞产生细胞因子。由于目前对于炎症状态下内皮细胞功能调整的药物都是间接的,因此直接影响血管内皮细胞功能的炎症治疗方法值得期待^[4]。

人真皮微血管内皮细胞(human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC)是皮肤细胞生物学结构的重要组成部分,是体表免疫的关键启动器^[7]。温灸可以刺激真皮微血管内皮细胞(启动)、脉管系统内皮细胞(传递)和炎症病灶处的微血管内皮细胞(效应器),使其在炎症免疫中发挥主动功能。有研究发现,

艾灸与温热刺激(≥43 ℃)均可引发局部的微循环变化^[8],而 HDMEC 是温灸效应启动环节的细胞结构之一。脉管系统是神阙治疗的效应途径,内皮细胞(微血管内皮细胞)是神阙治疗的细胞途径,而神阙是全身唯一具备血管横断面结构特异性的穴位^[1]。神阙穴具有丰富的血管联系,通过附脐静脉与门静脉、下腔静脉直接相通,肚脐下没有皮肤筋膜、脂肪组织等,有丰富的毛细血管和静脉网^[1]。肝圆韧带腔面覆盖有单层扁平内皮细胞,温灸、药物敷贴治疗可以直接影响血管内膜的内皮细胞功能^[2]。本课题组前期对于神阙灸的研究表明,神阙是躯干部微循环最丰富的穴位,其血管结构特征和丰富的微循环为神阙穴发挥治疗作

用奠定了结构基础,且经重复温灸后,神阙微循环的改变幅度也非常显著^[1,3]。龚廷贤《万病回春》盛誉熏脐法“灸之百脉和畅,毛窍皆通,上至泥丸,下至涌泉”;《肘后备急方》记载了“以盐纳脐中,灸百壮,治霍乱卒死”。系列温灸拮抗慢性炎症性疾病(高脂血症、动脉硬化)的研究表明,温灸在抗炎的同时还可保护 ECs^[9-13],这些研究还提示,ECs 功能变化与温灸的抗炎效应密切相关。

研究表明,超过体温的温热刺激(39℃、41℃、43℃)达 1 h,对血管内皮细胞具有细胞毒效应^[14],呈温度和时间依赖性。瞬时受体电位通道-香草醛亚型 1(transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1) 表达于内皮细胞^[15]。基于对温热刺激的感受并激活 TRPV1 的阈值温度是 43℃^[15],一般认为温灸的起效温度是 43℃。由于反复刺激会降低 TRPV1 的激活阈值^[17],所以 TRPV1 的激活温度在 40~43℃。有研究发现,43℃ 温热刺激 0.5 h 和 40℃ 温热刺激 0.5 h 均可提升 HUVECs 内 Caspase-3 基因和蛋白的表达^[18]。还有研究发现,40℃ 温度刺激 0.5 h 可提高 HUVECs 的生长活力和 HUVECs 内三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、一磷酸腺苷的含量^[19],增加细胞内线粒体数量^[16]。本课题组根据神阙灸温度刺激的曲线^[20],选择了 43℃ 温热刺激 4 min,间隔 1 min 的重复温热刺激方式,结果发现,重复温热刺激的方式是提高灸治强度的有效方法之一,其不仅可使内皮细胞温度感受敏化,激活阈值降低,增强温热刺激的效能,还可避免长时间 43℃ 温热刺激对于细胞的伤害性。

综上所述,重复温热刺激可以提高炎症状态下内皮细胞的生长活力,降低自身的炎症反应和黏附分子的表达,即对炎症反应具有一定的抑制作用。本研究的结果只是初步的,温热感受蛋白激动后效应在内皮细胞的传递、效应环节的作用仍需进一步验证,mECs 的温热感受蛋白激动后与免疫细胞的相互作用,以及 mECs 在不同脏器的异质性作用等也留待后续的研究去探索。

参 考 文 献

[1] 蒋颖,戴文君,姜劲峰. 腹部常用穴位区微循环血流灌注量的差异及不同温度艾灸的影响[J]. 南京中医药大学学报,2017,33(4): 339-343. DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0339.

[2] 李明华,应大君,糜建红,等. 肝圆韧带的断面解剖及其显微结构成份分析[J]. 第三军医大学学报,1994,16(5):322-325. DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.004

[3] 姜劲峰,徐旺芳,俞兴根,等. 基于血管生物学的神阙穴特异性解析[J]. 中国针灸,2017,37(12):1304-1308. DOI:10.13703/j.0255-2930.2017.12.014.

[4] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation[J]. Nat Rev Immunol,2007,7(10):803-815. DOI:10.1038/

nri2171.

[5] Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation[J]. J Immunol,2007,178(10):6017-6022. DOI:10.4049/jimmunol.178.10.6017.

[6] 杨志虹,肖金良,崔瑾,等. 体外温热刺激对脐静脉血管内皮细胞线粒体及三磷酸腺苷含量影响的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(2):1-4. DOI:10.3969/j.issn.1002-1108.2014.02.001

[7] Dalessandri T, Strid J. Beneficial autoimmunity at body surfaces - immune surveillance and rapid type 2 immunity regulate tissue homeostasis and cancer[J]. Front Immunol,2014,5:347. DOI:10.3389/fimmu.2014.00347.

[8] 施睿,邱悦,余芝,等. 不同温度艾灸对施灸局部微循环影响的实验观察[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(05):1092-1094. DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2016.05.065.

[9] 谢文娟,常小荣,刘密,等. 艾炷灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞超微结构的影响[J]. 实用中医内科杂志,2012,26(8):9-12. DOI:10.3969/j.issn.1671-7813.2012.07.04.

[10] 章海凤,刘密,常小荣,等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞 NF-κB 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(4):914-917.

[11] 岳增辉,严洁,常小荣,等. 隔药饼灸对兔高脂血症合并动脉粥样硬化血管内皮细胞粘附因子 E 选择素 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(7):37-39. DOI:10.3969/j.issn.1005-5304.2006.07.019

[12] 蔡海红,王玲玲,姜劲峰,等. 温和灸对动脉粥样硬化家兔 CD40-CD40L 轴的影响[J]. 中国针灸,2014,34(1):55-60. DOI:10.13703/j.0255-2930.2014.01.021.

[13] 嵇明月,王玲玲,姜劲峰,等. 温和灸对高脂血症大鼠主动脉形态及内皮炎症反应的影响[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1783-1786. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2013.07.110.

[14] 潘志国,耿焱,张剑明,等. 热刺激对体外培养的血管内皮细胞损伤及 IL-6、TNF-α 释放的影响[J]. 山东医药,2012,52(3):32-35. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2012.03.010.

[15] Baylie RL, Brayden JE. TRPV channels and vascular function[J]. Acta Physiol,2011,203(1):99-116. DOI:10.1111/j.1748-1716.2010.02217.x.

[16] Caterina MJ. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2007,292(1):R64-R76. DOI:10.1152/ajpregu.00446.2006.

[17] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway[J]. Nature,1997,389(6653):816-824. DOI:10.1038/39807.

[18] 杨孝芳,张宁,杨志虹,等. 灸法热刺激对脐静脉血管内皮细胞 Caspase-3 表达影响的研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(6):1505-1507. DOI:10.3969/j.issn.1008-0805.2017.06.086.

[19] 杨志虹,肖金良,杨孝芳,等. 体外温热刺激对脐静脉血管内皮细胞能量物质的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(1):255-258.

[20] 吴晓静,姜劲峰,荣长保,等. 神阙隔盐灸温度-时间曲线分析[J]. 上海针灸杂志,2017,36(6):761-764. DOI:10.13460/j.issn.1005-0957.2017.06.0761.

(修回日期:2021-08-01)

(本文编辑:阮仕衡)