

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.19.001

文章编号: 1005-8982(2020)19-0001-06

基础研究·论著

小分子化合物诱导骨髓间充质干细胞 类神经分化的实验研究*

李光然¹, 邱裕佳¹, 段思腾¹, 马义勇¹, 李宇², 王伟³

(1. 锦州医科大学附属第一医院, 辽宁 锦州 121001; 2. 辽宁中医药大学研究生院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 锦州医科大学骨外科学研究所, 辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 探讨小分子化合物组合 (Forskolin、SB431542、DMH1、CHIR99021) 诱导骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 类神经分化的可行性。**方法** 全骨髓贴壁法分离大鼠 BMSCs, 流式细胞仪鉴定细胞。培养细胞至第3代, 以含有 Forskolin 的神经元培养基预诱导 1 d, 再以含有 Forskolin、SB431542、DMH1、CHIR99021 的神经元培养基正式诱导 3 d。以神经元培养基为对照组。通过观察细胞形态、免疫荧光检测、Western blotting 技术对类神经分化细胞进行鉴定。**结果** 大鼠 BMSCs 以梭形细胞为主, 可见长短不一的突起; 经流式细胞仪鉴定, CD90、CD105 表达呈阳性, 而 CD34 和 CD45 表达呈阴性。诱导后, 细胞有神经样形态改变, 免疫荧光检测到神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、巢蛋白 (Nestin) 阳性表达, 诱导 3 d 后 Western blotting 显示实验诱导组与对照组比较, NSE、Nestin 和 SOX1 表达增多 ($P < 0.05$)。**结论** 小分子化合物组合 (Forskolin、SB431542、DMH1、CHIR99021) 可诱导 BMSCs 类神经分化。

关键词: 间充质干细胞; 小分子化合物; 类神经分化

中图分类号: R741; R318.08

文献标识码: A

Experimental study of neural differentiation induced by small molecular compounds in bone marrow mesenchymal stem cells*

Guang-ran Li¹, Yu-jia Qiu¹, Si-teng Duan¹, Yi-yong Ma¹, Yu Li², Wei Wang³

(1. The First Affiliated Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. School of Graduate, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110016, China; 3. Department of Orthopedics Research Institute, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into neural cells induced by small molecule compound FSDC (Forskolin, SB431542, DMH1, CHIR99021). **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated by whole bone marrow adherence and identified by flow cytometry. Cells were cultured to the third generation, pre-induced with Forskolin-containing neuronal culture medium for 1 day, and formally induced for 3d with neuron culture medium containing Forskolin, SB431542, DMH1 and CHIR99021. The neuron culture medium was used as the control group. The neuron-differentiated cells were identified by observation of cell morphology, immunofluorescence and Western blotting. **Results** Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells were mainly spindle-shaped cells, showing irregular protrusions. The expression of CD90 and CD105 was positively detected by flow cytometry, while the expression of CD34 and CD45 was negative.

收稿日期: 2020-03-27

* 基金项目: 辽宁省自然科学基金 (No: 201602322); 辽宁省教育厅科学技术研究地方服务项目 (No: JYTFUDF201757)

[通信作者] 王伟, E-mail: weiwang_ly@126.com

After induction, the cells showed obvious neuromorphic changes. The positive expression of NSE, Nestin were detected by immunofluorescence. After 3 days of induction, Western blotting showed that the expression of NSE, Nestin and SOX1 in the experimental group was significantly increased compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Small molecule compounds combined with FSDC can induce neural differentiation of BMSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells; small molecule compound; nervous differentiation

神经系统疾病是发生于中枢神经系统、周围神经系统、自主神经系统的,以感觉、运动、意识、自主神经功能障碍为主要表现的疾病,是对人类生命危害很大的疾病之一^[1]。随着再生医学的发展,诱导干细胞神经分化的细胞替代疗法已成为治疗神经系统疾病的新途径^[2]。诱导方法和细胞来源是细胞替代疗法的 2 个关键点。目前,小分子化合物以其使用便捷性、可控性和功能多样性等方面的显著优势,被广泛用于诱导干细胞增殖和分化^[3]。CHAMBERS 等^[4]报道,2 种 Smad 信号通路抑制剂(SB431542+ 重组 Noggin)协同诱导胚胎干细胞或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)表达神经外胚层早期标志物 PAX6 和 SOX1,从而实现类神经分化。此诱导方法称为双 Smad 抑制。而在此诱导分化过程中,加入 Wnt 信号通路激活剂 CHIR99021 可提高诱导效率,快速、有效地诱导 iPSCs 向类神经分化^[5]。此外,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种成体干细胞,相比于胚胎干细胞有不涉及伦理问题的优势,且具有多向分化、来源广泛、取材相对容易、致瘤风险低的特点^[6]。本研究应用小分子化合物诱导 BMSCs 类神经分化并进行鉴定,探讨其可行性,意在拓展神经系统疾病替代疗法的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胎牛血清(德国 Sera Pro 公司),DMEM/F12 培养液、胰蛋白酶、青链霉素(美国 HyClone 公司), Forskolin、SB431542、DMH1、CHIR99021(美国 Selleck 公司), Neurobasal 培养基、B27、NEAA(美国 Gibco 公司),表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)(美国 PeproTech 公司),L-谷氨酰胺、DAPI 染料(美国 Sigma 公司),兔抗 CD34 抗体、兔抗 CD45 抗体、兔抗 CD90 抗体、兔抗 CD105 抗体、兔抗 NSE 抗体、兔抗 Nestin 抗体、兔抗 SOX1 抗体及兔抗 Actin 抗体(美国 Abcam 公司),山羊抗兔二抗(美国 Earthox 公司),蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE

凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),蛋白 Marker、Triton X-100(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs 取 4 周龄 SD 大鼠 4 只,无特定病原体(SPF)级,体重(100 ± 10)g/只,由锦州医科大学实验动物中心提供。脱颈处死,于 75% 酒精中消毒 15 min,随后置于超净工作台。无菌条件下分离双侧股骨和胫骨,以含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基反复冲洗骨髓腔,收集冲洗液充分吹打至细胞悬液。以 1×10^6 个/L 密度接种至培养皿中,放置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。48 h 首次半量换液,72 h 全量换液,以后每 2 天全量换液 1 次。待贴壁细胞达到 80% ~ 90% 融合后,按 1 : 2 比例传代。

1.2.2 流式细胞仪鉴定 BMSCs 取生长状态良好的第 3 代 BMSCs,制备单细胞悬液,以 1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,4% 多聚甲醛 4℃ 固定 30 min,0.1% Triton X-100 室温通透 10 min,加入一抗(CD34、CD45、CD90、CD105),4℃ 孵育 2 h。洗涤 2 次,加入荧光素标记的二抗,4℃ 孵育 30 min,避光,上机检测。

1.2.3 小分子化合物诱导 BMSCs 类神经分化 取生长状态良好的第 3 代 BMSCs,以 5×10^5 个/ml 密度接种于培养皿,待细胞生长到 70% 后随机分为实验诱导组和对照组开始诱导。对照组以神经元培养基诱导 4 d;实验诱导组以预诱导培养基诱导 1 d,然后以诱导培养基诱导 3 d。神经元培养基包含 DMEM/F12; Neurobasal (1 : 1) 培养基,1% B27,1% NEAA,1% 青/链霉素,20 ng/ml EGF,10 ng/ml bFGF,0.2% 肝素。预诱导培养基包含:神经元培养基,10 μ mol/L Forskolin。诱导培养基包含:神经元培养基,0.1 mmol/L 抗坏血酸,2 μ mol/L CHIR99021,4 μ mol/L DMH1 和 4 μ mol/L SB431542。诱导方案见表 1。

1.2.4 倒置显微镜观察细胞形态 倒置显微镜观察 BMSCs 分离培养过程中,诱导开始后第 1、2 及 3 天的细胞数量、形态、生长状况,记录并采集照片。

1.2.5 免疫荧光鉴定 BMSCs 类神经分化 去除培养

表 1 BMSCs 类神经分化诱导方案

组别	预诱导	时间	诱导	时间
对照组	神经元培养基	1 d	神经元培养基	3 d
实验诱导组	预诱导培养基	1 d	诱导培养基	3 d

基, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.1% Triton X-100 室温通透胞膜 10 min, 1% BSA 室温封闭 60 min, 加入一抗 NSE、Nestin, 4℃ 孵育过夜。二抗室温孵育 2 h, DAPI 染核 5 min, 荧光淬灭剂封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.6 Western blotting 检测特异性蛋白表达水平 提取蛋白样品并调整至同等浓度 (3 μg/μl), 制备 10% SDS-PAGE 凝胶, 上样电泳后转移至 PVDF 膜, 1% BSA 封闭 1 h, 加入一抗 NSE、Nestin、SOX1、β-actin, 4℃ 过夜, 加入二抗室温孵育 2 h, ECL 显色显影拍照。所得条带用 Image J 软件分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

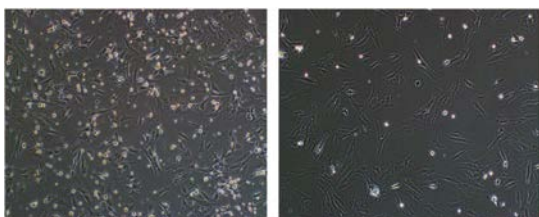
2.1 BMSCs 的鉴定结果

观察原代细胞, 多为梭形或多角形, 大小不一, 换液去除杂质细胞后可见短梭形、星形细胞分散贴壁生长。细胞传代后可见伸出长短不一、粗细不均的突起, 以梭形细胞为主, 细胞生长旺盛。见图 1。

流式细胞仪检测结果显示, 第 3 代细胞的间充质干细胞表面标志抗原 CD90、CD105 表达呈阳性, 阳性率分别为 98.23%、99.27%; 而造血干细胞表面标志抗原 CD34、CD45 表达呈阴性, 阳性率分别为 1.09%、0.14%。见图 2。

2.2 BMSCs 诱导后的细胞形态

诱导第 1 天, 可见少数细胞折光性变强, 有较长



原代细胞 (×100) 第 2 代细胞 (×100)

图 1 BMSCs 生长状态

突起; 诱导第 2 天, 细胞形态变化更加明显, 突触伸长, 形成分支, 并交织成网, 呈神经细胞样形态, 折光性更加明显; 诱导第 3 天, 突起增多, 相互连接成网。见图 3。

2.3 免疫荧光鉴定 BMSCs 诱导后蛋白表达

将诱导 3 d 后的细胞进行免疫荧光染色, 可见实验诱导组细胞被神经特异性标志物 NSE、Nestin 标记, PBS 对照组未被荧光标记。见图 4。

2.4 BMSCs 诱导后特异性蛋白表达水平

Western blotting 检测细胞神经特异性蛋白的表达水平, 结果显示: NSE 表达水平从对照组 (0.463 ±

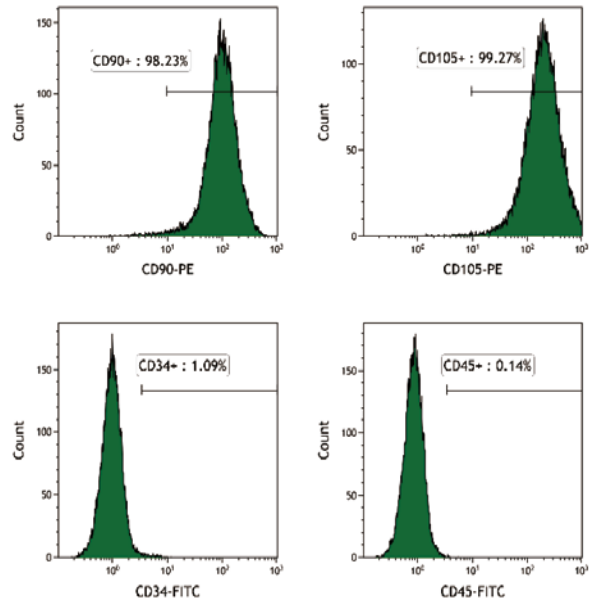
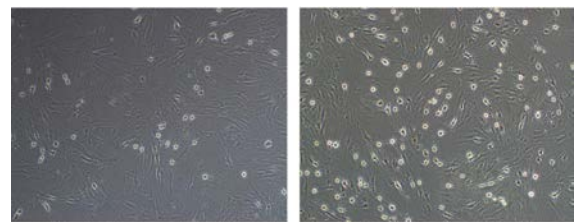
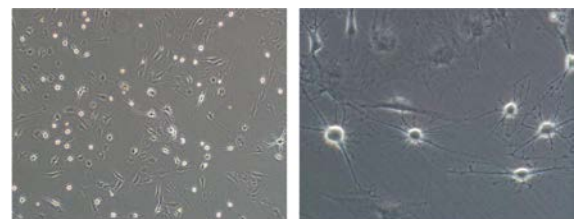


图 2 CD34、CD45、CD90、CD105 阳性率情况



第 1 天 (×100) 第 2 天 (×100)



第 3 天 (×100) 第 3 天 (×400)

图 3 BMSCs 诱导过程中细胞形态变化

0.154) 上调至实验诱导组 (0.918 ± 0.232), Nestin 表达水平从对照组 (0.602 ± 0.207) 上调至实验诱导组 (1.616 ± 0.337), SOX1 表达水平从对照组

(0.510 ± 0.187) 上调至实验诱导组 (1.272 ± 0.328), 组间比较, 差异有统计学意义 ($t=2.822, 4.443$ 和 3.503 , $P=0.048, 0.011$ 和 0.025)。见图 5。

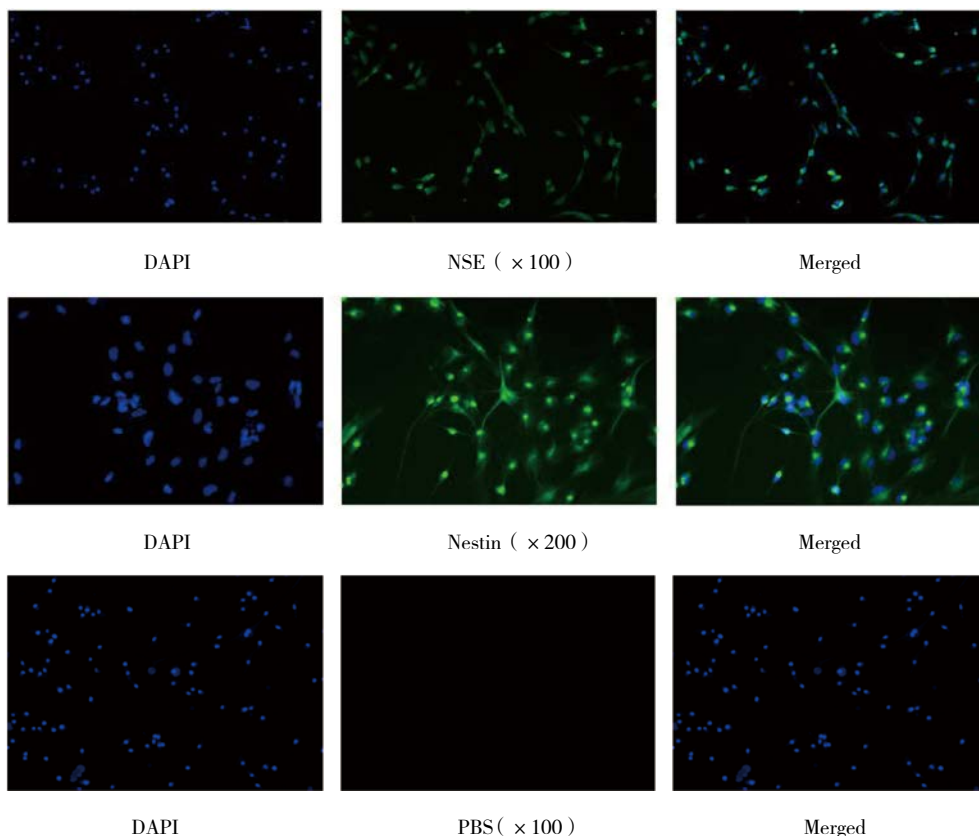
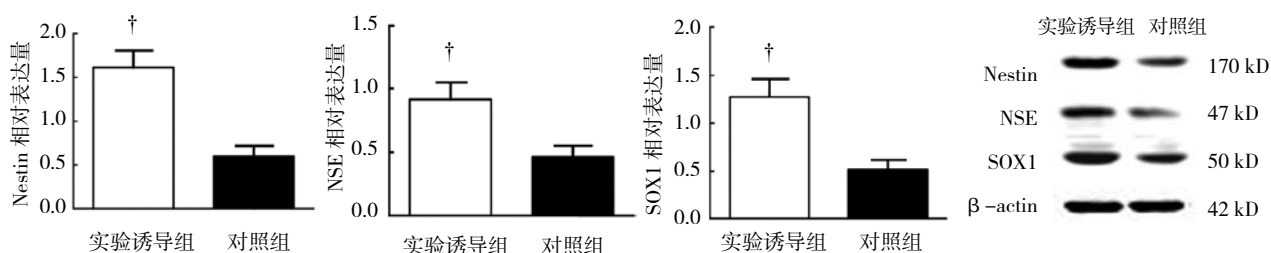


图 4 神经特异性标志物表达



† 对对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 诱导后细胞神经特异性蛋白表达水平比较

3 讨论

化学生物学是利用活性的小分子化合物干预蛋白功能和解析生物系统, 从而认识生物系统的本质和内在规律的交叉学科^[7]。小分子化合物能快速诱导干细胞分化, 时间上精确可控, 作用效果通常可逆, 通过改变小分子的浓度进行微调^[8]。与重组蛋白质比较, 合成的小分子化合物可以更稳定、更容易量化、有效性可重复, 并且生产成本要低得多, 这对细胞生产来

说尤为重要^[9]。

本研究基于小分子化合物作用于特定信号通路的作用特点, 采用协同分步诱导的方式, 应用小分子化合物诱导 BMSCs 类神经分化。首先, 预诱导阶段使用添加 Forskolin 的神经元培养基, 培养持续 1 d。Forskolin 是腺苷酸环化酶激活剂, 通常用于提高环磷酸腺苷 (cAMP) 和 cAMP 效应元件结合蛋白 (CREB) 水平^[10], 可以调节神经元分化并促进轴突再生^[11]。其

次, 联合应用小分子化合物 SB431542、DMH1 和 CHIR99021 协同诱导 BMSCs 类神经分化。研究表明, SB431542 和 DMH1 可以有效抑制转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路^[12]。TGF- β 信号通路是一个多功能细胞因子大家族, 参与胚胎的发育及组织、器官的形成与修复^[13]。TGF- β 信号通路可分为 TGF- β /Activin/Nodal 和 BMP/GDF/MIS 2 个亚家族通路^[14], 被激活后通常引起胚胎干细胞向中胚层分化。激活该信号通路首先需要 TGF- β 配体分子与受体结合, 从而使受体 T β Rs 磷酸化, 磷酸化的 T β R-I 直接作用于 Smads 蛋白, 活化的 Smads 将信号从细胞膜、胞浆传递到细胞核内, 调控细胞的生物过程^[15]。而已有实验表明当抑制 BMP 或敲除 Smad4 时, 胚胎干细胞向神经外胚层发育^[16]。研究证实, DMH1 能够抑制 BMP 信号通路, 阻断下游 Smad1、Smad5 和 Smad8 磷酸化从而诱导 hESCs 神经分化^[17]; 同样, 研究显示 SB431542 能够抑制 TGF- β , 阻断下游的 Smad2、Smad3 磷酸化从而增强 hESCs 神经胚状体产生^[18]。CHAMBERS 等^[4]报告, 在细胞贴壁培养条件下同时抑制 2 种信号通路, 足以诱导 80% 以上的 hESCs 实现快速和完全的神经分化。单独抑制一种通路时, 神经外胚层分化的早期标志物 PAX6 阳性率低于 10%, 表明协同抑制增加神经诱导效率。此诱导方法称为双 Smad 抑制。双 Smad 抑制可能包含以下几个潜在机制, 破坏 Activin 和 Nanog 介导的多能网络, 抑制 BMP 诱导 hESCs 分化为滋养细胞谱系^[19], 通过抑制 Activin 和 BMP 信号来抑制 hESCs 向中/内胚层谱系分化^[20], 并通过抑制 BMP 促进神经外胚层的分化^[21]。

此外, CHIR99021 是一种 GSK3- β 抑制剂, 能够激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 推动 PAX、SOX1、NGN2 转录因子转录, 作为一种有效的化学助剂增强神经分化^[22]。此外, Wnt/ β -catenin 是已知的、能够与 Notch 形成复合物, 增强 HES1 表达, 从而促进神经干细胞增殖并抑制其分化^[23-24]。因此, Wnt/ β -catenin 信号被 GSK3 β 抑制剂激活, 可以直接增强神经诱导初始步骤相关基因的转录, 并且还可以促进诱导分化系统中神经干细胞的增殖。

在过去几年中, BMSCs 已被认为是用于细胞治疗和再生重要细胞来源。BMSCs 具有较高可塑性, 在体外和体内的适当条件下, BMSCs 可以表达中胚层、外胚层和内胚层的多种基因, 分别分化为 3 个胚层的多种细胞类型^[25]。最近的研究表明, BMSCs 的神经可塑

性对治疗各种神经系统疾病具有重要作用^[26]。本研究结果显示, 诱导过程中观察细胞发生明显神经样改变, 诱导后表达 NSE、Nestin 和 SOX1, 结果表明该组合能够诱导 BMSCs 类神经分化。然而, 小分子化合物作用于细胞信号通路的同时, 可能会对细胞产生毒性作用。本研究联合应用小分子化合物 (Forskolin、SB431542、DMH1、CHIR99021) 诱导 BMSCs 过程中发现, 当正式诱导第 2 天, 个别细胞出现凋亡现象; 第 3 天时发现大片细胞凋亡。SURMACZ 等^[27]发现在诱导分化过程中, 当 DMH1 浓度高于 5 μ mol/L 时会产生细胞毒性, 推测可能是 DMH1 影响细胞内其他分子靶点所致。提示不同干细胞对小分子化合物的浓度敏感性不同, 同时小分子化合物对细胞的毒性作用是亟待解决的难题。

化合物诱导干细胞分化有良好的应用前景和优势, 相比传统的基因操作方式易于操作、作用可控。但是其分子机制目前尚不完全清楚, 其诱导过程安全性也仍需提高, 还需要优化小分子化合物组合协同诱导细胞分化。随着研究深入, 这将会推动再生医学蓬勃发展, 为神经系统疾病的治疗方法带来深远影响。

参 考 文 献:

- [1] 单威, 余勤, 刘丽珍, 等. 诱导性多能干细胞向神经细胞分化的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(9): 82-86.
- [2] ZHANG Y, LI W L, LAURENT T, et al. Small molecules, big roles—the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming[J]. J Cell Sci, 2012, 125(23): 5609-5620.
- [3] CHENG L, HU W X, QIU B L, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia[J]. Cell Research, 2014, 24(6): 665-680.
- [4] CHAMBERS S M, FASANO C A, PAPAPETROU E P, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3): 275-280.
- [5] SHIMOJO D, ONODERA K, DOI-TORII Y, et al. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells[J]. Mol Brain, 2015, 8(1): 79-94.
- [6] ZHAO H, CHENG L, DU X W, et al. Transplantation of cerebral dopamine neurotrophic factor transduced BMSCs in contusion spinal cord injury of rats: Promotion of nerve regeneration by alleviating neuroinflammation[J]. Molecular Neurobiology, 2016, 53(1): 187-199.
- [7] 李文林, 张冠宇, 孙平新. 干细胞研究中的化学生物学: 学科交叉的新前沿 [J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(2): 133-141.
- [8] XU Y, SHI Y, DING S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine[J]. Nature, 2008, 453(7193): 338-344.

- [9] FENG L L, COOK B, TSAI S Y, et al. Discovery of a small-molecule BMP sensitizer for human embryonic stem cell differentiation[J]. *Cell Reports*, 2016, 15(9): 2063-2077.
- [10] BABOS K, ICHIDA J K. Small molecules take a big step by converting fibroblasts into neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 127-129.
- [11] LI X, ZUO X H, JING J Z, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 195-203.
- [12] DU Z W, CHEN H, LIU H S, et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(3): 6626-6635.
- [13] NEELY M D, LITT M J, TIDBALL A M, et al. DMH1, a highly selective small molecule BMP inhibitor promotes neurogenesis of hiPSCs: comparison of PAX6 and SOX1 expression during neural induction[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2012, 3(6): 482-491.
- [14] 刘镛, 赵琴平, 董惠芬, 等. TGF- β 信号传导通路及其生物学功能 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(1): 77-83.
- [15] 陈兵, 易斌, 鲁开智. Smad 蛋白家族调控细胞分化的研究进展 [J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(5): 544-547.
- [16] ZHOU J X, SU P, LI D, et al. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(10): 1741-1750.
- [17] HAO J, HO J N, LEWIS J A, et al. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors[J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(2): 245-253.
- [18] PARK I H, ZHAO R, WEST J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-146.
- [19] SONG L Q, WANG K, LI Y, et al. Nanotopography promoted neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016(148): 49-58.
- [20] LUPO G, NOVOROL C, SMITH J R, et al. Multiple roles of Activin/Nodal, bone morphogenetic protein, fibroblast growth factor and Wnt/ β -catenin signalling in the anterior neural patterning of adherent human embryonic stem cell cultures[J]. *Open Biol*, 2013, 3(4): 1-13.
- [21] JADALANNAGARI S, BERRY A M, HOPKINS R A, et al. Potential mechanisms underlying ectodermal differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 831-837.
- [22] XI J J, LIU Y, LIU H S, et al. Specification of midbrain dopamine neurons from primate pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(8): 1655-1663.
- [23] CHEN X, LI Q Y, XU H W, et al. Sodium iodate influences the apoptosis, proliferation and differentiation potential of radial glial cells in vitro[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(4): 1109-1124.
- [24] LU J F, LIU H S, HUANG C T, et al. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(5): 1580-1591.
- [25] KIM D Y, LEE J, KANG D, et al. Multipotent neurogenic fate of mesenchymal stem cell is determined by Cdk4-mediated hypophosphorylation of Smad-STAT3[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13): 1787-1795.
- [26] ZHANG Z Y, ALEXANIAN A R. The neural plasticity of early-passage human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their modulation with chromatin-modifying agents[J]. *Journal of Tissue Engineering & Regenerative Medicine*, 2014, 8(5): 407-413.
- [27] SURMACZ B, FOX H, GUTTERIDGE A, et al. Directing differentiation of human embryonic stem cells toward anterior neural ectoderm using small molecules[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(9): 1875-1884.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 李光然, 邱裕佳, 段思腾, 等. 小分子化合物诱导骨髓间充质干细胞类神经分化的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(19): 1-6.