

朱丽茹,赵德善. 人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 821-825.

Zhu LR, Zhao DS. Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid-cancer cell lines [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 821-825.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 06. 021

人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展

朱丽茹,赵德善*

(山西医科大学第二医院核医学科,太原 030001)

【摘要】 甲状腺癌在内分泌恶性肿瘤中居于首位。甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型是人类甲状腺癌的一个缩影,对甲状腺癌的发病机制、药物治疗及¹³¹I治疗的机制等研究都有重要的意义。了解和熟知甲状腺癌免疫缺陷鼠建模过程中实验动物选择、关键实验操作,以及明确实验动物碘营养状况和血清促甲状腺激素水平等关键影响因素可以有效提高建模成功率。因此,本文就影响人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模成功的相关因素做一简要综述。

【关键词】 甲状腺癌;异种移植模型;促甲状腺激素;碘

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0821-05

Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid cancer cell lines

ZHU Liru, ZHAO Deshan*

(Department of Nuclear Medicine, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Corresponding author: ZHAO Deshan.E-mail:deshanzh@vip.163.com

【Abstract】 Thyroid carcinoma ranks first among the malignant endocrine tumors. Immunodeficient mice or rat models of thyroid cancer-cell-line transplantation represent microcosms of human thyroid cancer, which are of great significance for the study of the pathogenesis of thyroid cancer, drug therapy and the mechanism of iodine-131 treatment. Understanding the key influences in the modeling of thyroid cancer immunodeficient mice or rats could improve the success rate of modeling. Therefore, the factors affecting the successful modeling of human thyroid cancer cell-lines in immunodeficient mice and rats are briefly reviewed in this paper.

【Keywords】 thyroid carcinoma; xenograft model; thyroid stimulating hormone; iodine; mouse; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

甲状腺癌是一种常见的内分泌恶性肿瘤,其发病率逐年增高,我国肿瘤登记中心相关数据表明,近年来,甲状腺癌位居城市地区女性恶性肿瘤第4位,据估计未来我国甲状腺癌发病率将以每年20%的速度不断增长^[1]。应用甲状腺癌免疫缺陷鼠模型

的动物实验在研究甲状腺癌的发病机制、发展过

[作者简介] 朱丽茹(1993—),女,硕士在读,主要从事甲状腺癌¹³¹I治疗研究。Email: 1397293938@qq.com

[通信作者] 赵德善,男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事甲状腺癌¹³¹I治疗研究。Email:deshanzh@vip.163.com

程及有效治疗方法等方面作用重大。因此,如何成功建立有效的人甲状腺癌免疫缺陷鼠模型是实验顺利进行的基础。本文就影响人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模成功的相关因素做一简要综述。

1 一般影响因素

1.1 肿瘤细胞株

1.1.1 肿瘤细胞株种类

目前用于细胞水平及移植动物模型研究的甲状腺癌细胞株种类繁多,根据分化类型可分为分化型甲状腺癌细胞株和未分化型甲状腺癌细胞株,而同等数量未分化或分化程度低的肿瘤细胞较分化程度高的肿瘤细胞接种时造模成功率更高。国内学者^[2]通过建立不同分化程度的甲状腺癌免疫缺陷小鼠模型,评估其对化疗敏感性的研究显示,低分化及未分化甲状腺癌造模成功率相对高于乳头状甲状腺癌,说明肿瘤细胞的分化程度与建模能否成功密切相关。出现此类现象,与肿瘤细胞的恶性程度有关,肿瘤细胞分化程度越低其恶性程度越高。肿瘤细胞的增殖不同于正常细胞有自限性,且随着肿瘤细胞恶性程度的增加,其自身增殖能力增强,接近无限性增殖,因此造模成功率较高。

1.1.2 肿瘤细胞株的接种

接种的肿瘤细胞数量应介于 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 / 0.1 \text{ mL}$,每只 0.2 mL ^[3],因此接种时应进行多次细胞计数取均值、“Z”字形进针以防止注射后细胞外溢,来确保移植细胞数量的准确性;接种的肿瘤细胞应选择处于对数生长期的细胞,胰酶消化贴壁细胞时应注意消化时间不应过度消化,保证细胞存活率 > 90%,以避免肿瘤细胞移植失败或移植后细胞变异。

1.1.3 移植方式

肿瘤细胞接种成功与否决定了造模的成败,其主要影响因素包括接种的细胞状态、数量级方式。根据实验目的不同接种方式可分为皮下接种、原位移植和静脉或心脏注射肿瘤细胞株等。皮下接种便于观察免疫缺陷鼠成瘤情况,对实行不同干预条件的实验对象有更直观的评估。皮下接种时,以近头侧皮肤松弛部较近尾侧成功率高且成瘤体积大,最佳注射部位为腋窝中部外侧皮下^[4],注射时以形成一个突起的皮丘为宜。原位移植的甲状腺癌免疫缺陷鼠模型能更准确的模拟肿瘤的生长情况,Morrison 等^[5],利用未分化甲状腺癌(anaplastic

thyroid cancer, ATC)细胞株 8505C、T238 及乳头状甲状腺癌(papillary thyroid cancer, PTC)细胞株 K1/GLAG-66、BCPAP,以浓度为 $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ mL}$,每只 0.5 mL ,借助显微镜寻找免疫缺陷小鼠甲状腺后进行腺体内注射,于 4~5 周后以大于 90%的造模成功率建立了甲状腺癌免疫缺陷小鼠原位移植模型。原位移植的甲状腺癌免疫缺陷小鼠模型的建立对操作者的专业素质要求较高,造模过程中常因找不到正常甲状腺组织而使原位移植造模失败。静脉或心脏注射肿瘤细胞株是制作远处转移瘤模型的有效方法,对研究肿瘤在体内的生物学行为及转移瘤的治疗等有极大的价值,相关学者^[6]利用 ATC 细胞株 8505C、C-643、SW-1736 及滤泡状甲状腺癌(follicular thyroid cancer, FTC)细胞株 FTC-133、FTC-236 等,经 8~12 周的 SCID 免疫缺陷小鼠尾静脉注射 0.2 mL 含 $3 \times 10^4 \sim 7.5 \times 10^5$ 个肿瘤细胞的细胞悬液,成功建立了甲状腺癌肺转移及骨转移模型。

目前国内外已有部分学者逐渐将免疫缺陷大鼠应用于人源性肿瘤组织异种移植模型中,如彭秀华等^[7]为评价涉及肝、血管等外科操作的肝转移治疗模式,成功地在 26 只 5 周龄裸大鼠(rnu/rnu)(CrI:NIH-Foxnl)体内建立了人结肠癌细胞肝转移模型;贾罗琦等^[8]为获得较大的瘤组织及利于手术操作,成功建立了 10 只 4~5 周龄健康雌性裸大鼠(rnu/rnu)乳腺癌皮下移植瘤模型;国外学者^[9]采用 3~5 周龄雄性裸大鼠(NIH-rnu)成功建立了原位非小细胞肺癌裸大鼠模型。综上所述,因大鼠甲状腺体积大于小鼠的甲状腺组织,在甲状腺癌原位移植模型建立过程中应用免疫缺陷大鼠可有效降低手术操作困难程度,进一步提高造模成功率。

1.2 免疫缺陷鼠

1.2.1 免疫缺陷鼠

免疫缺陷鼠是指由于先天性遗传缺陷或用人工方法造成免疫系统一种或多种成分缺陷的小鼠或大鼠,在研究人类许多疾病机理、研发药物、器官移植等工作中有重要的作用。自 1968 年相关科学家发现裸小鼠无正常胸腺、外周血淋巴细胞数量稀少以来,科学家们培育出了多种免疫缺陷鼠杂交品系,其中有免疫缺陷小鼠及免疫缺陷大鼠,如:多种免疫细胞缺陷的 SCID 小鼠、B-nsg 小鼠、FPG 大鼠及 F344RG 大鼠等。

如前所述,近年来国内部分异种移植模型的研究中应用了裸大鼠,目前成功造模的免疫缺陷大鼠

异种移植肿瘤有黑色素瘤、恶性胶质瘤、结肠癌、肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肝癌等。免疫缺陷小鼠较免疫缺陷大鼠在造模应用方面更为普遍,且具有价廉、易饲养、成本低、来源广及造模成功率高等特点,但近年来免疫缺陷大鼠的应用在逐渐增多。虽然免疫缺陷大鼠较免疫缺陷小鼠费用昂贵且在饲养等方面维持经费高,但是由于免疫缺陷大鼠与免疫缺陷小鼠生物学特性相似,且体型较大、适应性强、皮下成瘤体积大、取血量多、便于手术操作以及便于影像学观察等优势,在国外大量研究中,免疫缺陷大鼠在各类人类肿瘤的异种移植、药物研究、用于整形的皮肤移植等领域已得到广泛地应用^[10]。而在用于多学科异种肿瘤研究方面,尤其是影像学评价时,免疫缺陷大鼠肿瘤模型具有明显优势。

1.2.2 鼠龄及生长环境

大部分免疫缺陷鼠并非完全缺乏免疫细胞,比如无胸腺裸鼠,体内几乎无 T 淋巴细胞,但 NK 细胞和 B 淋巴细胞活性仍然很高,而免疫缺陷鼠生长环境无法绝对无菌化,随着鼠龄的增加环境中的感染源可刺激其体内 NK 细胞等免疫细胞的活性增加,从而影响移植瘤免疫缺陷鼠模型的成功制作。3 周龄及以下的幼龄鼠虽较 6~8 周龄的成年鼠更易成瘤,且瘤体侵袭性及转移性更高,但幼龄鼠发育不成熟,成瘤后死亡率较高,且不利于观察及进行后续实验研究。因此,从成瘤率和实验便利性角度出发,在相对无菌的通风清洁 SPF 级环境中,饲喂的 6~8 周龄的成年免疫缺陷鼠将成为最佳人肿瘤细胞接种鼠。

2 特异影响因素

2.1 免疫缺陷鼠的血清促甲状腺激素水平

促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 具有促进甲状腺滤泡上皮细胞增生、合成与分泌甲状腺激素等作用,在免疫缺陷鼠中 TSH 增高有助于肿瘤细胞的增殖。相关临床研究显示^[11], TSH 水平在分化型甲状腺癌患者中明显高于良性甲状腺结节患者;且 TSH 浓度与分化型甲状腺癌发病率及淋巴结转移有明显的相关性;另外,当 TSH 水平升高,病变肿瘤体积也相应变大,提示血清 TSH 水平不仅对甲状腺癌的发生、发展有相关性,并且也是影响肿瘤生长体积的一个重要因素。

有研究者^[12]将浓度为 $1 \times 10^6/0.1$ mL 的人乳头状甲状腺癌细胞 (TPC-1) 皮下接种于 35 只雄性裸

小鼠 (BALB/c-nu/nu) 颈背部,同时分为 7 组,给予不同浓度的重组人促甲状腺激素,观察 16 d;结果显示,当作用的 TSH 达到一定浓度时,裸鼠成瘤速度较其他相关建模实验^[13]明显加快(第 3 天成瘤),且成瘤速度及肿瘤的体积与 TSH 浓度有相关性;同时,该实验用放射免疫法对瘤组织中的甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, Tg) 进行测定,结果显示 Tg 的浓度与肿瘤体积的大小呈正相关。

目前对于 TSH 在甲状腺癌发生发展中的具体作用机制没有明确的定论,但相关临床研究及动物实验表明^[14],正常生理情况下, TSH 与位于甲状腺滤泡基底膜的促甲状腺激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) 结合,通过腺苷酸环化酶,引起 c-AMP 信号通路级联,调节甲状腺碘处理基因: Tg、甲状腺过氧化物酶 (thyroid peroxidase, TPO)、钠碘转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 等的表达;而在分化型甲状腺癌中 TSH 通过结合血管内皮生长因子、细胞生长因子及胰岛素样生长因子等细胞因子,引起受体功能区内基因的突变,致使其下游信号分子异常表达,直接或间接诱导分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid cancer, DTC) 的发生,促进 DTC 癌细胞的增殖分化、侵袭和转移;同时, TSH 可能会通过影响相关氧化蛋白酶信号通路诱导分化型甲状腺癌的发生和发展。

因此,在人甲状腺癌细胞株移植裸鼠模型建立过程中,一定浓度的血清 TSH 水平,对提高建模的成功率,加快免疫缺陷鼠成瘤有重要的意义,同时可减少接种所用癌细胞量,相对降低实验成本。

对于提高免疫缺陷鼠血清 TSH 水平的方法有:肌肉注射重组人促甲状腺激素;在建立异种甲状腺癌模型前先使免疫缺陷鼠甲状腺功能降低或缺失,即先建立甲减免疫缺陷鼠模型,利用甲状腺激素分泌的负反馈调节作用使免疫缺陷鼠血清 TSH 水平升高可增加建模成功率。对于成年的免疫缺陷鼠甲减模型的制备可根据具体实验需求及实验条件选用以下三种方法:药物诱导甲减模型^[15], ¹³¹I 诱导甲减模型^[16]及甲状腺切除甲减模型^[17]。

2.2 免疫缺陷鼠的碘营养状态

碘是调节人体甲状腺发育和功能的重要元素。碘不仅维持正常的甲状腺细胞同源异型增生,而且对甲状腺癌的发生也有一定的影响。更重要的是,

碘可以诱导甲状腺癌细胞的细胞周期阻滞和凋亡^[18]。

相关研究显示^[19],碘摄入量与甲状腺疾病发生发展的关系呈 U 型曲线,碘摄入不足和过量均会导致甲状腺癌的发生;其中慢性碘缺乏一直被认为是滤泡状甲状腺癌的危险因素^[20];而在既往碘缺乏的地区,在碘预防前后的研究中表明,补充碘可能会增加甲状腺乳头状癌的发病率^[21]。碘缺乏引起的甲状腺癌组织病理学和激素水平变化与碘缺乏引起高甲状腺素血症的机制是一致的,这种机制是通过下丘脑-垂体-甲状腺轴的负反馈机制使 TSH 分泌增加来实现的。同时,低水平的碘可以通过促进活性氧而导致 DNA 损伤和突变,在一些致癌因素,如辐射及化学药物等存在时可促进肿瘤的发生^[22]。然而,过量碘的促肿瘤机制还没有得到很好的研究。

在关于碘营养状态与甲状腺癌关系的动物实验研究中发现,低碘饮食的雌性大鼠 TSH 升高,54%~100%大鼠发生甲状腺肿瘤,主要是滤泡状腺瘤和滤泡状癌。用高碘饮食(约碘 120 mg/d)喂养大鼠 9 个月,发现 40%实验鼠甲状腺重量增加,但没有肿瘤发生^[23]。

韩国是一个碘含量丰富的地区,据统计^[24]韩国是世界上甲状腺癌发生率最高的国家之一。因此有学者研究了碘摄入量与甲状腺癌在韩国甲状腺结节患者之间的关系^[25],结果发现 1170 名甲状腺结节患者中 18%经手术证实为甲状腺癌,而其中 98%的患者被确诊为甲状腺乳头状癌,且其尿碘值均高于世界卫生组织的标准(100~199 $\mu\text{g/L}$)。

因此,在制作人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型过程中,可根据所接种细胞株的种类不同对免疫缺陷鼠碘营养状况进行人为干预,以促进肿瘤形成。

甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型是人类甲状腺癌的一个缩影,对甲状腺癌的发病机制、药物治疗及¹³¹I 治疗的机制等研究都有重要的意义;了解和熟知甲状腺癌免疫缺陷鼠建模过程中实验动物的选择、关键实验操作,以及明确实验动物血清 TSH 水平和碘营养状况等关键影响因素可以有效提高建模成功率,一个高效且成功的甲状腺癌动物模型可以缩短实验时间,节约实验成本,使研究者更好的完成实验研究内容,对研究甲状腺癌的防治措施至关重要。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 甲状腺癌诊疗规范(2018 年版) [J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2019, 13(1): 1-15.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment guidelines for thyroid cancer (2018 edition) [J]. Chin Arch Gen Surg (Electronic Edition), 2019, 13(1): 1-15.
- [2] 安常明. 甲状腺低分化癌裸鼠移植瘤模型的建立及化疗敏感性研究 [D]. 北京:北京协和医学院;中国医学科学院, 2010. An CM. Establishment of ectopic model of poorly differentiated thyroid carcinoma in athymic nude mice and testing of chemosensitivity in vivo and in vitro [D]. Beijing, Peking Union Medical College; Chinese Academy of Medical Sciences, 2010.
- [3] 田庆镗,李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素 [J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3): 47-50. Tian QE, Li ML. The effect factors of transplantation after human tumor cell suspension inoculated subcutaneously into nude mice [J]. Lab Anim Sci Manage, 2004, 21(3): 47-50.
- [4] 施新猷,王四旺,顾为望,等. 比较医学 [M]. 西安:陕西科学技术出版社, 2003. Shi XY, Wang SW, Gu WW, et al. Comparative Medicine [M]. Xi'an: Shaanxi, Science and Technology Press, 2003.
- [5] Morrison JA, Pike LA, Lund G, et al. Characterization of thyroid cancer cell lines in murine orthotopic and intracardiac metastasis models [J]. Horm Cancer, 2015, 6(2-3): 87-99.
- [6] Zhang L, Gaskins K, Yu Z, et al. An in vivo mouse model of metastatic human thyroid cancer [J]. Thyroid, 2014, 24(4): 695-704.
- [7] 彭秀华,沈艳,徐春华,等. 裸大鼠人高转移肝癌皮下和原位移植模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(1): 33-37. Peng XH, Shen Y, Xu CH, et al. Establishment of subcutaneous and orthotopic transplant tumor model of hepatocellular carcinoma cell line with high metastatic potential in nude rat [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(1): 33-37.
- [8] 贾罗琦,王超,程明军,等. 裸大鼠人乳腺癌皮下移植瘤模型的建立和评价 [J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41(5): 685-689. Jia LQ, Wang C, Cheng MJ, et al. Establishment and evaluation of the animal model of human breast carcinoma with nude rats [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2014, 41(5): 685-689.
- [9] Vercio J, Johnston W, Frost M, et al. Inhaled submicron particle Paclitaxel (NanoPac) induces tumor regression and immune cell infiltration in an orthotopic athymic nude rat model of non-small cell lung cancer [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2019, 32(5): 266-277.
- [10] 沈艳,周文江,杨永昕,等. 裸大鼠生物学特性的初步观测 [J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(1): 44-47. Shen Y, Zhou WJ, Yang YX, et al. Preliminary observation of biological characteristics of nude rats [J]. Lab Anim Comp Med, 2009, 29(1): 44-47.
- [11] 李轩,赵占吉,范筱勇,等. 血清促甲状腺激素浓度与分化型

- 甲状腺癌的关系研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(2): 107-109.
- Li X, Zhao ZJ, Fan XY, et al. Study on correlation between thyroid stimulating hormone and differentiated thyroid cancer [J]. Chin J Biol Med, 2015, 35(2): 107-109.
- [12] 董天思. 促甲状腺激素(TSH)对裸鼠甲状腺乳头状癌组织的影响及意义[D]. 石家庄:河北医科大学, 2016.
- Dong TS. Effect of thyroid stimulating hormone (TSH) on the growth of thyroid papillary carcinoma in nude mice [D]. Shijiazhuang: Hebei Med Univ, 2016.
- [13] 张蓉, 俞立波, 李梅芳, 等. 具有摄碘功能甲状腺乳头状癌移植瘤裸鼠模型的建立 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(9): 775-778.
- Zhang R, Yu LB, Li MF, et al. Establishment of nude mice xenograft model of papillary thyroid carcinoma with the ability of ^{99m}Tc -intake [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30(9): 775-778.
- [14] Kim HI, Jang HW, Ahn HS, et al. High serum TSH level is associated with progression of papillary thyroid microcarcinoma during active surveillance [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(2): 446-451.
- [15] Demir S, Üñibol M, Aypak SÜ, et al. Histopathologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease in hypothyroidism-induced rats [J]. Int J Endocrinol, 2018, 103(2): 446-451.
- [16] 孟召伟, 贾强, 王深, 等. 核因子- κB 抑制剂增强 ^{131}I 治疗甲状腺癌疗效的裸鼠实验研究 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(2): 129-133.
- Meng SW, Jia Q, Wang S, et al. Enhancement of ^{131}I therapeutic efficacy on differentiated thyroid cancer by nuclear factor- κB inhibitor in nude mice [J]. Chin J Nucl Med Mol Imag, 2013, 33(2): 129-133.
- [17] da Conceição RR, Laureano-Melo R, Oliveira KC, et al. Antidepressant behavior in thyroidectomized Wistar rats is induced by hippocampal hypothyroidism [J]. Physiol Behav, 2016, 157: 158-164.
- [18] Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, et al. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2009, 46(5-6): 302-318.
- [19] Laurberg P, Bülow Pedersen I, Knudsen N, et al. Environmental iodine intake affects the type of nonmalignant thyroid disease [J]. Thyroid, 2001, 11(5): 457-469.
- [20] Burgess JR, Dwyer T, McArdle K, et al. The changing incidence and spectrum of thyroid carcinoma in Tasmania (1978-1998) during a transition from iodine sufficiency to iodine deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(4): 1513-1517.
- [21] Bacher-Stier C, Riccabona G, Tötsch M, et al. Incidence and clinical characteristics of thyroid carcinoma after iodine prophylaxis in an endemic goiter country [J]. Thyroid, 1997, 7(5): 733-741.
- [22] Zhang J, Zhang XC, Li YN, et al. Low dose of Bisphenol A enhance the susceptibility of thyroid carcinoma stimulated by DHPN and iodine excess in F344 rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(41): 69874-69887.
- [23] 朱林波, 李鹏飞, 张鹏斌. 碘营养失衡与甲状腺癌的关系 [J]. 浙江医学, 2018, 40(14): 1644-1646, 1650.
- Zhu LB, Li PF, Zhang PB. Relationship between iodine imbalance and thyroid cancer [J]. Zhejiang Med J, 2018, 40(14): 1644-1646, 1650.
- [24] Shin HR. Global activity of cancer registries and cancer control and cancer incidence statistics in Korea [J]. J Prev Med Public Health, 2008, 41(2): 84-91.
- [25] Kim HJ, Kim NK, Park HK, et al. Strong association of relatively low and extremely excessive iodine intakes with thyroid cancer in an iodine-replete area [J]. Eur J Nutr, 2017, 56(3): 965-971.

[收稿日期] 2019-06-15