

# MiR-361-3p 下调 STC2 抑制头颈部鳞状细胞癌的作用研究

王浩然<sup>1</sup>, 杨玉兰<sup>1</sup>, 梁俊青<sup>2</sup>

(1. 内蒙古医科大学附属肿瘤医院 科研部, 内蒙古 呼和浩特 010017;  
2. 内蒙古医科大学附属肿瘤医院 乳腺外科, 内蒙古 呼和浩特 010017)

**【摘要】**目的 探讨STC2调控HNSCC进展的作用机制。方法 HNSCC相关mRNA和miRNA通过对The Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库分析整理获取。随后,通过MTT法、集落形成实验、流式细胞检测和迁移侵袭法,验证STC2下调后,对HNSCC细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。再利用生物信息学数据库,预测潜在靶向STC2的miRNA。通过qRT-PCR和荧光素酶报告基因实验,对预测获取的miR-361-3p干扰STC2的表达能力进行验证。最后,通过动物移植瘤模型验证了miR-361-3p通过下调STC2对HNSCC肿瘤发挥抑制作用。结果 STC2在HNSCC细胞中高表达。在体外,下调STC2抑制HNSCC细胞的增殖、迁移和侵袭,促进HNSCC细胞的凋亡。荧光素酶报告基因实验证实miR-361-3p可能是STC2的上游调控因子。过表达miR-361-3p下调STC2,可以抑制HNSCC细胞增殖、迁移和侵袭,促进HNSCC细胞的凋亡。结论 STC2在HNSCC细胞中呈高表达。miR-361-3p负调控STC2,进而改变HNSCC的相关细胞进展。

**【关键词】**斯钙素2;miR-361-3p;头颈部鳞状细胞癌;增殖;迁移

中图分类号: R34

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)04-0405-05

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是一种头颈部最常见的恶性肿瘤。虽然放疗同步化疗联合尼妥珠单抗治疗局部晚期颈部食管鳞癌较同步放化疗在3个月内具有较好的近期疗效<sup>[1]</sup>,不仅未增加不良反应,还具有较高的安全性,但是在过去的几十年里,无论是通过根治性的手术还是放疗和化疗,HNSCC患者的预后和生存率都没有明显改善,患者初治后5年生存率较低<sup>[2]</sup>。因此,探索新的治疗靶点以提高患者生存率,防治肿瘤进展势在必行<sup>[3,4]</sup>。

斯钙素2(stanniocalcin-2, STC2)是斯钙素家族的一员,由302个氨基酸组成,与STC1高度同源。STC2参与多种生物过程,如骨骼发育、再生、伤口修复、血管再生和调节炎症反应等<sup>[5-7]</sup>。目前,已有研究<sup>[6,8]</sup>表明STC2在人胃癌、神经母细胞瘤、乳腺癌等肿瘤中表达上调。另外,一项包含214个临床HNSCC样本的研究<sup>[9]</sup>表明,STC2的高表达可能是一种有价值的生物标志物,也是手术后患者预后较差的预测因子。然而,目前STC2在HNSCC中的确切机制尚不清楚。

MicroRNA(miRNA)是一种短链非编码RNA<sup>[10]</sup>。

一个miRNA可以直接或间接调控数百个靶点,直接或间接参与了细胞增殖、自噬、凋亡、迁移、转移和血管生成等多种生物学行为<sup>[11,12]</sup>。miRNA已被证明在许多类型的癌症中表达异常。有研究表明<sup>[12]</sup>,miR-361-3p在甲状腺和宫颈癌等肿瘤中表达明显下调。本研究旨在探讨miR-361-3p在HNSCC调控中的作用。现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 生物信息学分析

我们对包括TCGA在内的6个数据库进行分析(TCGA、starbase、miRDB、Targetscan、miRWalk以及TarBase),HNSCC患者的TCGA生存数据是从cBioPortal for Cancer Genomics (<https://www.cbioportal.org>)中提取的。基于多个数据库综合结果,进行总生存期(OS)、受试者特征曲线(ROC)等分析。

### 1.2 体外实验细胞来源

通过比对最终选取TU686、TU177和AMC-HN-8作为实验中所需的HNSCC细胞株。并向中国科学院细胞库(上海,中国)进行申购,再向Gibco公司

收稿日期:2023-03-10;修回日期:2023-06-23

第一作者:王浩然(1993—),男,硕士,住院医师。研究方向:肿瘤学。E-mail:whr0925@126.com

\*通信作者:梁俊青,男,医学博士后,主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:乳腺外科。

E-mail:liang\_junqing@126.com

申购实验中所需 DMEM 培养基、以及配置培养液所需的血清抗体(胎牛血清、青霉素-链霉素双抗)、磷酸盐缓冲液及胰蛋白酶等, HNSCC 细胞置于培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

### 1.3 SiRNA、慢病毒构建

向 GenePharma 公司(上海, 中国)购买序列为 5'-GACGA ACAGT CTGAG TATTC TGATA-3' 的 Si-STC2 及序列为 5'-GCGTT AACAA GGTAG TATCT TACGA-3' 对照 si-NC。同时向 Genechem 公司(上海, 中国)申购实验所需的 3 种慢病毒, 分别为 miR-361-3p (Lv-miR-361-3p)、STC2 (Lv-STC2) 和阴性对照 (Lv-NC)。

### 1.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Trizol (Invitrogen) 用于对细胞 RNA 的提取。同时利用 Hairpin-it<sup>TM</sup> miRNA 定量试剂盒 (GenePharma, 上海, 中国) 和 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 福斯特市, 加利福尼亚州, 美国) 分别对 MiRNAs 和 mRNA 的表达水平进行测试。我们将 U6 和 GAPDH 设置为内参进行参考对照。最后, 通过 2- $\Delta\Delta C_t$  法完成对基因的表达量计算。

### 1.5 细胞增殖实验

MTT 法被用来对细胞增殖能力进行实验研究。将已经完成转染实验的目标细胞以  $2 \times 10^3$ /孔的密度, 转移种植到标准规格型号的 96 孔板, 设定在 24 h, 48 h 和 72 h 固定时间对孔中细胞进行计数, 并统计获取细胞增殖情况。具体如下: 取 20  $\mu$ L 的 MTT 溶液, 滴入各孔中, 并将处理过的孔板置于培养箱中, 上述培养条件下培养 4 h。4 h 后用 DMSO 替换培养基, 在 490 nm 处测定吸光度。所有实验均重复 3 次。

### 1.6 集落形成实验

在集落实验中, 我们以 500 个细胞/孔的密度对细胞进行转移接种, 培养孔板选择正常规格 6 孔板。加入完全培养基后, 置于培养箱 10 d, 取孔板, 移弃孔板中上清液, 后移加甲醇, 固定 10 min, 用 1% 结晶紫染液染色 5 min, PBS 洗 3 遍后, 计数细胞集落。

### 1.7 凋亡实验

首先, 将细胞用 PBS 洗涤, 胰酶消化离心后, 加入 195  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞; 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀; 加入 10  $\mu$ L 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀; 室温 (20 °C~25 °C) 避光孵育 10~20 min。使用流式细胞仪 (FACSCalibur, Becton Dickinson) 检测细胞凋亡情况。

### 1.8 Transwell 法

Transwell 实验被我们用来验证迁移能力的改变, 移液枪取 100  $\mu$ L 细胞均匀的悬液, 将悬液移入 Corning (康宁, 纽约, 美国) 公司购买的 Transwell 小室, 悬液加入上室, 随后 500  $\mu$ L 的完全培养基加到 Transwell 小室的下室。培养 12 h 后, 用棉签小心去除小室上表面的细胞, 小室下表面的细胞用 0.1% 结晶紫染液染色。选择 5 个随机视野来计数迁移的细胞。

对于侵袭能力的检测, 在每个 Transwell 小室上室中加入 50  $\mu$ L BD Matrigel (BD Biosciences, 费兰克林湖, 新泽西州, 美国), 并在 37 °C 下温育 30 min, 使其凝固后接种细胞。后续步骤同迁移实验。

### 1.9 荧光素酶报告基因

PCR 扩增由 3'-UTR 荧光素酶报告载体构建的 STC2 野生型, 此外, mir-361-3p 结合位点的种子区突变构成相应的突变结构。野生型和突变型 3'-utr 均克隆到 psiCHECK-2 荧光素酶载体中。将 TU686 细胞种在 24 孔板中, 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 和适当的报告质粒和 miRNA 瞬时转染。使用双荧光素酶报告检测系统 (Promega, 麦迪逊, 威斯康星州, 美国) 测定 48 h 后荧光素酶活性。

### 1.10 免疫荧光

移除共聚焦皿中所置培养液, 对皿中细胞进行清洗, 该操作重复 3 次。4% 多聚甲醛被用来对细胞进行固定, 处理时长为 15 min, 后取出皿中所加多聚甲醛, 再次清洗皿中细胞, 仍为 3 次, 随后取 0.1% 浓度的 Triton X-100 破膜。该操作完成重复清洗操作, 清洗后加入 5% 浓度的 BSA 对实验皿进行封闭, 持续 30 min。接下来分别进行一抗和二抗温育。最后, 将细胞爬片小心取出, 反向盖在滴好封片液的载玻片上。

### 1.11 蛋白免疫印迹

实验中裂解液选择 RIPA, 其主要作用是从裂解细胞中获取蛋白质, 浓度参数为 10% 的 SDS-PAGE 胶为我们所选, 进行蛋白质分离所用, 将所获蛋白进行转膜, 移到 PVDF 膜上, 膜来源为 Amersham (Buckinghamshire, 英国)。移膜后, 配比脱脂奶粉到 5%, 并对膜进行封闭, 其中一抗的孵育时间需过夜, 一抗: STC2 (ab63057) 及所选内参 GAPDH (ab8245)。孵育一抗完成后, 选择 TBST 对膜进行清洗, 随后继续进行二抗孵育, 时间为 2 h。使用天能化学发光系统进行数据采集和处理。

### 1.12 移植瘤模型构建和免疫组化

选取无胸腺裸鼠购自湖南 SJA 实验动物中心

(长沙,中国)12只,雄性,5~6周龄,按随机数表法分为3组,每组4只。动物实验由内蒙古医科大学附属肿瘤医院审查并批准。将  $6 \times 10^6$  TU686/Lv-STC2、TU686/Lv-NC 和 TU686/Lv-miR-361-3p 细胞悬浮于 200  $\mu$ L PBS 中皮下注射到小鼠的右侧腋下。完成肿瘤后每隔 5 d 就需对肿瘤体积进行一次测量及记录统计,具体算法为:瘤体积=长 $\times$ 宽/2。在完成肿瘤后第 35 天,需对所有小鼠实施安乐死。所有肿瘤移植均被切除、称量、固定和包埋。

### 1.13 统计学分析

数据用 SPSS 统计学软件(22.0 版)进行分析,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。计量资料用 *t* 检验评估两组间的差异。检验水准为  $\alpha=0.05$ ,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 STC2 的表达水平与 HNSCC 患者的预后呈正相关

基于 TCGA 数据库的分析显示,STC2 高表达的 HNSCC 患者预后较 STC2 低表达的 HNSCC 患者差(图 1A 和 B)。HNSCC 队列中 STC2 的 ROC 曲线也显示变量 STC2 在预测 HNSCC 结局方面具有较高的准确性(AUC = 0.947, CI = 0.914-0.981)。

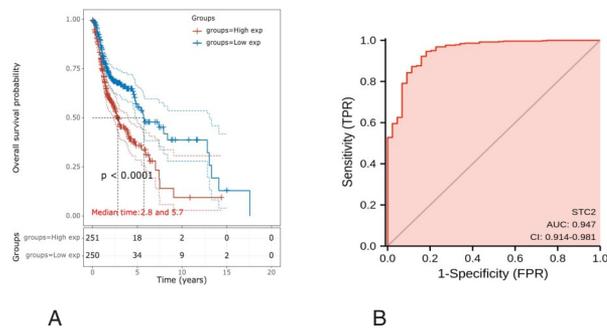


图1 mir-361-3p 的差异表达影响 HNSCC 患者生存率  
注: mir-361-3p 与低表达组比较\*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

### 2.2 STC2 的下调会对 HNSCC 细胞各种活性产生抑制

在 TU686 和 AMC-HN-8 细胞系中,STC2 均处于相对高表达状态(图 2A 和 B)。进行 qRT-PCR 和 Western Blots 后,分析统计可获知,两种不同 siRNA STC2 (si-STC2 和 si-STC2-1; 图 2C, D) 可以达到使 STC2 基因表达量降低的目的。MTT 实验结果显示下调 STC2 抑制 HNSCC 细胞进行增殖的功能(图

2E)。另外,通过克隆形成,我们也可获知 STC2 的下调一定程度上也阻碍了 HNSCC 细胞进行克隆复制的功能(图 2F)。流式细胞学结果显示,下调 STC2 促进 HNSCC 细胞凋亡(图 2G)。此外,下调 STC2 限制了 HNSCC 细胞的迁移和侵袭能力(图 2H, I)。所有结果表明,下调 STC2 显著抑制了 HNSCC 细胞的迁移和侵袭行为。

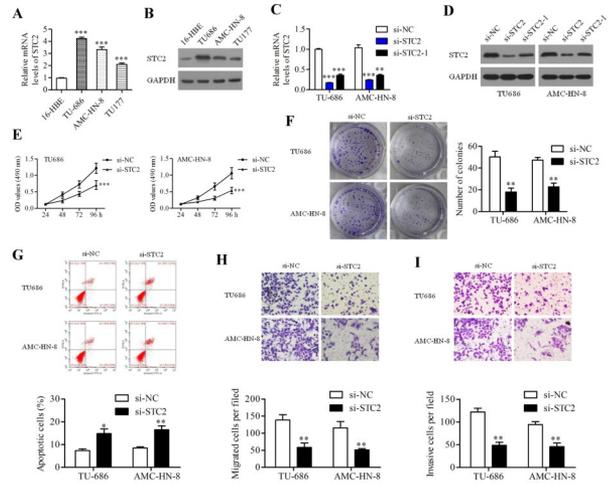


图2 下调 STC2 抑制 HNSCC 细胞生物学活性  
注: mir-361-3p 与对照组比较\*\*  $P < 0.001$ 。

### 2.3 在 HNSCC 中 miR-361-3p 是 STC2 的上游

我们结合来自不同数据库,例如 starbase 及 miRDB,并结合 Targetscan, miRWalk 和 TarBase 数据库相关数据,对 STC2 的下游基因进行预测,并筛选出 miR-361-3p(图 3A)。在分析 TCGA 数据库过程中,我们发现 miR-361-3p 及 STC2 在 HNSCC 中呈负相关( $r = -0.202$ ,  $P = 5.57e - 06$ ; 图 3B)。荧光素酶报告基因实验显示,转染 miR-361-3p 后,STC2-WT 组阴性荧光素酶活性明显降低(图 3C)。最后, qRT-PCR 和 Western Blots 结果显示,miR-361-3p 在 TU686 和 AMC-HN-8 细胞中低表达,转染 miR-361-3p 后 STC2 表达明显降低(图 3D, E, F)。

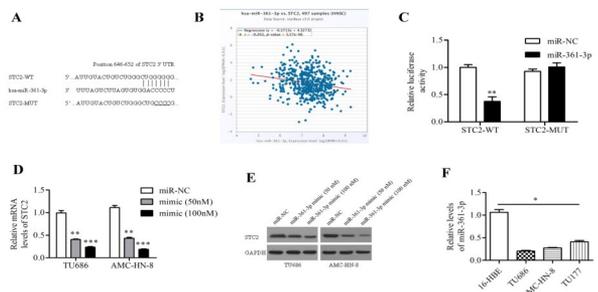


图3 在 HNSCC 中 miR-361-3p 是 STC2 的上游  
注: mir-361-3p 与对照组比较\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ 。

### 2.4 MiR-361-3p 通过下调 STC2 抑制 HNSCC 细胞生物学活性

我们通过 STC2 进一步探讨了 miR-361-3p 对 HNSCC 细胞功能的影响。Western Blots 结果显示, miR-361-3p 下调了 STC2 的表达(图 4A)。此外, MTT 实验显示, miR-361-3p 通过 STC2 抑制 HNSCC 细胞的增殖(图 4B)。克隆形成实验显示, miR-361-3p 抑制 HNSCC 细胞形成克隆的能力(图 4C)。流式细胞术结果显示, miR-361-3p 通过抑制 STC2 促进 HNSCC 细胞凋亡(图 4D)。此外, miR-361-3p 通过抑制 STC2 限制 HNSCC 细胞的迁移和侵袭(图 4E, F)。这些结果表明, miR-361-3p 通过下调 STC2 抑制 HNSCC 细胞的生物学功能。

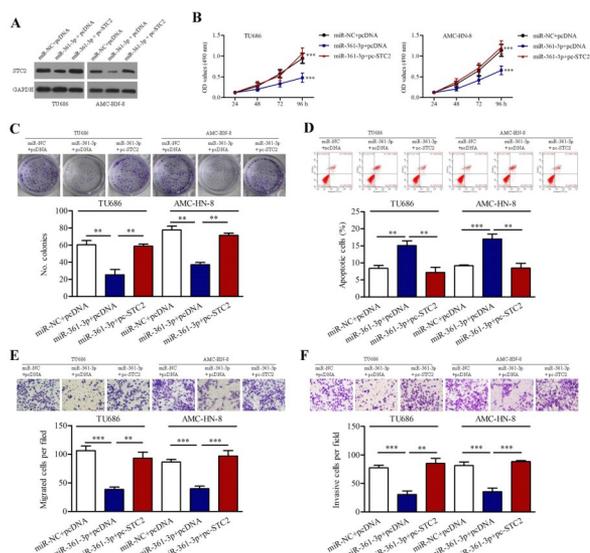


图 4 MiR-361-3p 通过下调 STC2 抑制 HNSCC 细胞生物学活性  
注: miR-361-3p 与对照组比较 \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

### 2.5 MiR-361-3p/STC2 在体内调节 HNSCC 肿瘤进展

裸鼠皮下肿瘤形成结果显示, miR-361-3p 负向调控 STC2, 抑制 HNSCC 肿瘤的生长, 与体积和重量无关(图 5A, B)。

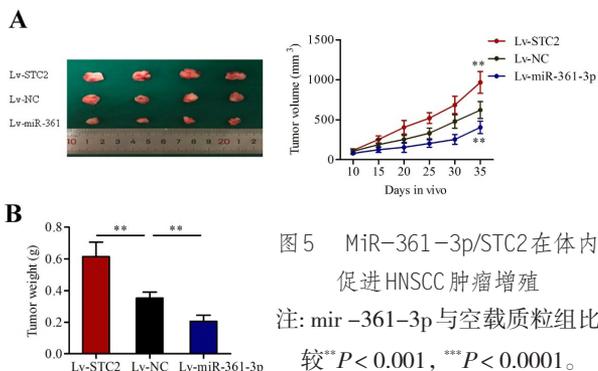


图 5 MiR-361-3p/STC2 在体内促进 HNSCC 肿瘤增殖  
注: miR-361-3p 与空载质粒组比较 \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0001$ 。

### 3 讨论

据我们所知, 这是第一个揭示 STC2 促进 HNSCC 进展的基础研究。在 HNSCC 中, STC2 呈现高表达。在 HNSCC 细胞中, miR-361-3p 下调 STC2 并抑制 HNSCC 细胞的生物学功能。

STC2 编码一种分泌的同二聚体糖蛋白, 在各种组织中广泛表达, 具有自分泌或旁分泌功能。Kita 和他的团队认为, 肿瘤组织中 STC2 高表达患者比 STC2 低表达患者的 5 年生存率更低<sup>[13]</sup>。越来越多的研究都描述了 STC2 在如结直肠癌, 抑或前列腺癌等多种人肿瘤组织中处于高表达状态<sup>[14, 15]</sup>。与此相同, 我们的研究结果表明, 高 STC2 表达预示 HNSCC 患者预后较差。现有的许多报道<sup>[16, 17]</sup>表明, STC2 对细胞增殖的影响可能依赖于特定的刺激和相关信号通路。基于此种情况, 我们对 STC2 在 HNSCC 发展中的情况进行了进一步研究。我们发现, STC2 具有促进 HNSCC 细胞进行增殖和克隆的能力, 与此同时, 又会抑制其凋亡进程。目前已有的研究<sup>[18]</sup>也有对 STC2 进行过表达处理, 会促进肿瘤细胞迁移, 并刺激进而加强其细胞活性, 该作用会与肿瘤组织的转移产生相关性。然而, Raulic 等<sup>[8]</sup>表明 STC2 的缺失与乳腺癌的侵袭性表型呈正相关。在我们的研究中, 我们发现 STC2 的高表达状态可以对 HNSCC 细胞的迁移侵袭进程产生正向反馈。

先前研究证明<sup>[16]</sup>, miRNAs 在某种程度上可以对肿瘤产生促进或抑制影响。在众多实验分析中, 我们也可发现 miRNAs 在影响肿瘤细胞的增殖及迁移侵袭进程中, 也扮演着举足轻重的作用, 例如 miRNA-143、miRNA-374b、miRNA-375 与胃癌的发生发展密切相关<sup>[19]</sup>, miR-301a 功能失调与 HNSCC 的发生发展相关<sup>[20]</sup>。在查阅大量文献后, 我们注意到 miR-361-3p 在 HNSCC 中所发挥的作用未有相关明确研究成果。结合文献我们发现, miR-361-3p 通常作为抑癌因子出现, 其所涉及瘤体包括: 甲状腺癌、宫颈癌和卵巢癌<sup>[11, 12, 21]</sup>。同时, 已有实验验证, 在宫颈癌中 miR-361-3p 的表达是骤降的, 换言之 miR-361-3p 在被抑制后, 其所影响的宫颈癌细胞增殖及侵袭能力被强化<sup>[21]</sup>。然而, 在 HNSCC 中, miR-361-3p 的作用未得到明确答案。在本研究中, 我们首次证明了 miR-361-3p 在 HNSCC 中表达下调, miR-361-3p 负向调控 STC2 表达, 抑制 HNSCC 增殖和肿瘤发生。这一结论是基于肿瘤组织和细胞系的实验结果得出的。

综上所述,我们的研究结果首次验证了STC2在HNSCC进展中的作用,miR-361-3p负向调控STC2,从而抑制HNSCC的进展。这可能为未来HNSCC提供有价值的治疗策略。

#### 参考文献

- [1]安志玲,林宇.调强放射治疗同步化疗联合或不联合尼妥珠单抗治疗局部晚期颈部食管鳞癌近期疗效的观察[J].内蒙古医科大学学报,2022,44(1):23-25+30
- [2]Wuthrick EJ, Zhang Q, Machtay M, et al. Institutional clinical trial accrual volume and survival of patients with head and neck cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(2):156-164
- [3]Chen Y, Li ZY, Zhou GQ, et al. An Immune-related gene prognostic index for head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1):330-341
- [4]Jin Y, Qin X. Significance of TP53 mutation in treatment and prognosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Biomark Med*, 2021, 15(1):15-28
- [5]Ma B, Xu X, He S, et al. STC2 modulates ERK1/2 signaling to suppress adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1):163-168
- [6]Ke J, Zhang BH, Li YY, et al. MiR-1-3p suppresses cell proliferation and invasion and targets STC2 in gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(20):8870-8877
- [7]Lin C, Sun L, Huang S, et al. STC2 Is a Potential prognostic biomarker for pancreatic cancer and promotes migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:8042489
- [8]Raulic S, Ramos VY, DiMattia GE. Stanniocalcin 2 expression is regulated by hormone signalling and negatively affects breast cancer cell viability in vitro[J]. *J Endocrinol*, 2008, 197(3):517-529
- [9]Zhou H, Li YY, Zhang WQ, et al. Expression of stanniocalcin-1 and stanniocalcin-2 in laryngeal squamous cell carcinoma and correlations with clinical and pathological parameters[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e95466
- [10]Verghese ET, Hanby AM, Speirs V, et al. Small is beautiful: microRNAs and breast cancer—where are we now[J]. *J Pathol*, 2008, 215(3):214-221
- [11]Wang L, Ren C, Xu Y, et al. The LINC00922 aggravates ovarian cancer progression via sponging miR-361-3p[J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1):77
- [12]Xia F, Chen Y, Jiang B, et al. Hsa\_circ\_0011385 accelerates the progression of thyroid cancer by targeting miR-361-3p[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20:49
- [13]Kita Y, Mimori K, Iwatsuki M, et al. STC2: a predictive marker for lymph node metastasis in esophageal squamous-cell carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(1):261-272
- [14]Zhang C, Chen S, Ma X, et al. Upregulation of STC2 in colorectal cancer and its clinicopathological significance[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:1249-1258
- [15]Tamura K, Furihata M, Chung SY, et al. Stanniocalcin 2 overexpression in castration-resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(5):914-919
- [16]Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-2 is a HIF-1 target gene that promotes cell proliferation in hypoxia[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(3):466-476
- [17]Law AY, Lai KP, Ip CK, et al. Epigenetic and HIF-1 regulation of stanniocalcin-2 expression in human cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(8):1823-1830
- [18]Volland S, Kugler W, Schweigerer L, et al. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(9):2049-2057
- [19]岳宏宇,陈平,丛春莉,等. miRNA在胃癌的发病机制及诊治方面的研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2020,42(3):325-328
- [20]Granda DR, Manterola L, Hermida PF, et al. Targeting oncogenic functions of miR-301a in head and neck squamous cell carcinoma by PI3K/PTEN and MEK/ERK pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161:114512
- [21]Li Y. MIR31HG exhibits oncogenic property and acts as a sponge for miR-361-3p in cervical carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(4):890-897
- [14]Hanlon P, Nicholl BI, Jani BD, et al. Frailty and pre-frailty in middle-aged and older adults and its association with multi-morbidity and mortality: a prospective analysis of 493 737 UK Biobank participants [J]. *Lancet Public Health*, 2018, 3(7):323-332
- [15]Salvi Fe, Rossi Lc, Lattanzio F, et al. Is polypharmacy an independent risk factor for adverse outcomes after an emergency department visit[J]. *Intern Emerg Med*, 2017, 12(2):213-220
- [16]杜春,陈平,王宏霞,等. 消化内科住院患者NRS-2002营养风险筛查及引港支持应用的调查与分析[J].内蒙古医科大学学报,2022,44(42):147-150
- [17]姬长珍,王慧媛,毛显春.老年住院患者营养状况与衰弱关系的研究[J].北京医学,2021,43(11):1123-1125
- [18]杨艳蓉,汪子琪,李铮,等.60岁以上住院患者衰弱现状及其与认知功能的相关性分析[J].中国全科医学,2020,23(17):2132-2136+2141
- [19]Wang Z, Hu XJ, Dai QX. Is it possible to reverse frailty in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2020, 75:1778
- [20]陈娟,谢军,孙媛媛,等.老年衰弱患者焦虑、抑郁、生活质量状况的分析[J].实用临床医学杂志,2019,23(4):73-77

(上接第404页)