

· 基础研究 ·

内毒素诱导 D-半乳糖胺致敏大鼠急性肝损伤相关指标的动态观察

陈 盛¹, 何念海^{1△}, 罗则佳²

(1. 第三军医大学西南医院儿科, 重庆 400038; 2. 成都军区总医院医务部, 成都 610083)

摘要:目的 动态观察内毒素(ET)诱导 D-半乳糖胺(D-GalN)致敏大鼠急性肝损伤的肝脏病理、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化,进而探讨 ET 肝损伤的机制,为临床治疗提供依据。**方法** 以腹腔注射脂多糖(LPS)50 μ g/kg+D-GalN 300 mg/kg 制备 LPS 诱导 D-GalN 致敏大鼠急性肝损伤动物模型,分别在给予 LPS 后 6、24、48 h 取材,肉眼及光镜观察肝组织的病理变化,全自动生化析仪检测 ALT、AST、TBIL 水平,原位末端标记法(TUNEL)检测肝细胞凋亡,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平。**结果** 模型组 6 h 无明显肉眼变化,24 h 及 48 h 肝脏光泽差,略显苍白,质地柔韧。光镜观察肝细胞模型组 6 h 出现轻度变性、肿胀;24 h 可见肝细胞广泛肿胀,点灶状坏死,炎症细胞浸润;48 h 时广泛水肿,大量点灶状坏死,大量炎症细胞浸润。模型组 ALT 在 24、48 h 较对照组明显升高($P<0.01$);模型组 AST 在 6 h 较对照组升高,24 h 达顶峰,48 h 开始下降,仍高于对照组($P<0.01$);模型组 TBIL 在 24、48 h 较对照组明显升高($P<0.01$)。对照组未见凋亡细胞,模型组在 6、24、48 h 凋亡细胞逐渐增多($P<0.01$);血清 TNF- α 、IL-1 β 在 6 h 即达峰值,24 h 开始下降,48 h 明显降低,但仍高于对照组($P<0.01$)。**结论** 细胞凋亡是其重要的形态学改变;LPS 肝损伤的发生与炎症介质 IL-1 β 和 TNF- α 早期高水平的表达密切相关,早期抑制炎症介质释放是减少 LPS 肝损伤的关键。

关键词:内毒素类;半乳糖胺;细胞凋亡;肝损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.06.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)06-0651-04

Dynamic observation on relevant data of acute liver injury induced by lipopolysaccharide in D-galactosamine-sensitized rats

Chen Sheng¹, He Nianhai^{1△}, Luo Zejia²

(1. Department of Pediatric, the Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Medical Administration, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: **Objective** To observe the changes of pathology of liver, serum ALT, AST, total bilirubin, IL-1 β and TNF- α levels of acute liver injury induced by lipopolysaccharide in D-galactosamine-sensitized rats, in order to investigate the pathogenesis of liver injury and provide the basis data for clinical treatment. **Methods** The mouse liver injury models were established by intraperitoneal injection of LPS(50 μ g/kg)and D-GalN(300 mg/kg). At 6, 24 and 46 h after LPS/D-GalN administration, pathological damages of liver tissues were observed with unaided eye and light microscope. Serum ALT, AST, and total bilirubin were detected by automatic biochemistry analyzer. Hepatocyte apoptosis was detected by TUNEL, and serum IL-1 β and TNF- α level were measured by ELISA. **Results** By naked eyes, the change on the whole liver was not distinct at 6 h after LPS/D-GalN administration, but the liver looked dim and pale slightly, and had a flexible texture at 24 h and 48 h. Mild degeneration and cellular swelling in liver cells were observed under microscope at 6 h, and extensive cellular swelling, local necrosis, and infiltration of inflammatory cells appeared at 24 h. At 48 h, the changes were more obvious. The levels of ALT in model group at 24 h and 48 h were significantly higher than those of the control group($P<0.01$). The levels of AST in model group began to ascend at 6 h, reached to climax at 24 h, and then decreased at 48 h, but they were higher than those in the control group($P<0.01$). The serum level of TBIL in model group at 24 h and 48 h were higher than those in the control group($P<0.01$). Apoptotic liver cells were not seen in control rats at all time points. In model group, apoptotic cells were gradually increased at 6 h, 24 h and 48 h($P<0.01$). The levels of TNF- α and IL-1 β reached a peak value at 6h after administration, then decrease at 24 h, and significantly decreased at 48 h, but it was still higher than those in the normal group ($P<0.01$). **Conclusion** Apoptosis is the important morphological feature in this process. Liver injury induced by LPS may be associated with the early high expression of IL-1 β and TNF- α . Inhibiting the release of inflammatory medium in early stage is the key to decrease liver injury induced by LPS.

Key words: endotoxins; galactosamine; apoptosis; liver injury

内毒素(endotoxin, ET)是革兰阴性细菌细胞壁中的一种成分,又称脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。LPS血症是严重创伤、感染、肝病以及众多危重疾病的常见并发症,它不仅可导

致全身炎症反应综合征(SIRS),严重者可导致多器官功能障碍综合征(MODS)。肝脏是清除 LPS 的主要器官,也是 LPS 血症时受损最早、最明显的器官之一,两者之间存在互为因果、

相互影响的关系,一旦发生容易形成恶性循环^[1]。本文建立了 LPS 诱导 D-半乳糖胺(D-GalN)致敏大鼠急性肝损伤动物模型,动态观察了肝损伤后大鼠肝脏病理、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的变化,以探讨其在 LPS 急性肝损伤发生、发展中的规律及临床意义,为寻求新的预防及治疗方法提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 Wistar 大鼠由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,雌雄不限,10~12 周龄,体质量 180~220 g 在清洁级环境中适应 1 周后进入实验,实验前 12 h 禁食,不禁水,实验后即正常进食、进水。

1.1.2 主要试剂及材料 D-GalN 购自重庆医科大学生化室, LPS 购自美国 Sigma 公司, Dab 显色试剂盒购自北京中山生物科技有限公司,原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司,大鼠 TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自武汉博士德公司,大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒购自北京北方伟业发展有限公司,光学显微镜(LEICA BF200 型)德国莱卡公司产品,全自动生化分析仪(H-7110)日本日立公司产品。

1.2 方法

1.2.1 LPS 诱导 D-GalN 致敏大鼠急性肝损伤动物模型的建立^[2]。48 只大鼠随机分为模型组和对照组,每组各 24 只。所有模型组大鼠均以 LPS(50 μ g/kg)+D-GalN(300 mg/kg)用 1 mL 无菌生理盐水溶解后腹腔内注射,对照组大鼠仅腹腔内注射 1 mL 生理盐水。

1.2.2 标本收集 每组分别在注射后 6、24、48 h 3 个时间点随机抽取 8 只大鼠,麻醉处死大鼠后取肝组织备送光镜及 TUNEL 分析、采血查 ALT、AST、TBIL、TNF- α 、IL-1 β 等。

1.2.3 光镜观察肝组织的病理变化 取右叶同一部位肝组织,置 10%甲醛磷酸盐缓冲液固定后,石蜡包埋,HE 染色,光镜下观察病理变化。

1.2.4 血清 ALT、AST、TBIL 水平检测 腹腔注射后 6、24、48 h 时取对照组、模型组血液,4 $^{\circ}$ C 全能型高速冷冻离心机(3 000 r/min)离心 5 min 取上层血清。全自动生化分析仪检测 ALT、AST、TBIL 水平。

1.2.5 肝细胞的凋亡检测 采用 TUNEL 检测,肝组织经多聚甲醛固定后,进行石蜡包埋、切片,切片常规脱蜡、水化后按

照 TUNEL 试剂盒操作说明书步骤进行。最后常规行 DSB 染色。光镜下观察,凋亡细胞核呈棕褐色为阳性。计算凋亡指数(apoptosis index,AI)用以判断肝脏损伤程度。不同的时间点每组取 2 张切片,每片随机选 5 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个肝细胞核,计算凋亡细胞百分比的均数,即为凋亡指数。

1.2.6 血清 TNF- α 、IL-1 β 水平检测 采用 ELISA 法,操作过程严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的均数比较采用一元方差分析(One-Way ANOVA),均数之间的多重比较采用 Scheffe 方法(方差齐)或者 Tamhane 方法(方差不齐)进行,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏的病理学观察

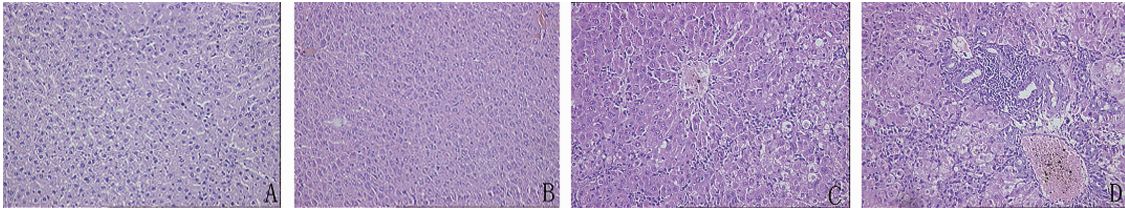
2.1.1 肉眼观察肝脏大体形态学改变 对照组肝脏形态正常,被膜光滑,色泽红润,质地柔软。模型组 6 h 无明显肉眼可见变化,24、48 h 肝脏光泽差,略显苍白,质地柔韧,未见明显出血点。

2.1.2 肝脏组织形态学光镜观察 对照组肝脏的肝小叶组织结构完整,未见肿胀、变性、坏死(图 1A)。模型组 6 h 可见肝细胞轻度变性、浊肿,未见坏死(图 1B);24 h 时可见肝细胞广泛浊肿,点灶状坏死,炎症细胞浸润,中央静脉扩张充血(图 1C);48 h 时见肝细胞广泛浊肿,大量点灶状坏死,大量炎症细胞浸润,中央静脉明显扩张充血(图 1D)。

2.2 大鼠血清 ALT、AST、TBIL 检测结果 模型组 ALT 在 24、48 h 较对照组明显升高,与对照组比较差异有统计学意义($F=63.63,P<0.01$);模型组 AST 在 6、24、48 h 较对照组明显升高,与对照组比较差异有统计学意义($F=76.15,P<0.01$),24 h 达顶峰,48 h 开始下降,但仍高于对照组;模型组 TBIL 水平在 24 h 明显升高,48 h 仍维持高水平,均与对照组比较差异有统计学意义($F=28.53,P<0.01$),见表 1。

表 1 各组血清 ALT、AST、TBIL 检测结果
($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(mmol/L)
对照组	59.88 $\pm$ 8.71	57.64 $\pm$ 13.71	14.00 $\pm$ 1.23
模型组 6 h	504.50 $\pm$ 143.61	626.875 $\pm$ 143.53	25.36 $\pm$ 12.09
模型组 24 h	3 204.88 $\pm$ 791.40	3 662.50 $\pm$ 725.66	65.10 $\pm$ 23.15
模型组 48 h	2 382.88 $\pm$ 695.54	1 936.63 $\pm$ 727.83	58.49 $\pm$ 3.43



A:对照组;B:模型组 6 h;C:模型组 24 h;D:模型组 48 h。

图 1 各组小鼠肝脏病理组织图 (HE $\times$ 400)

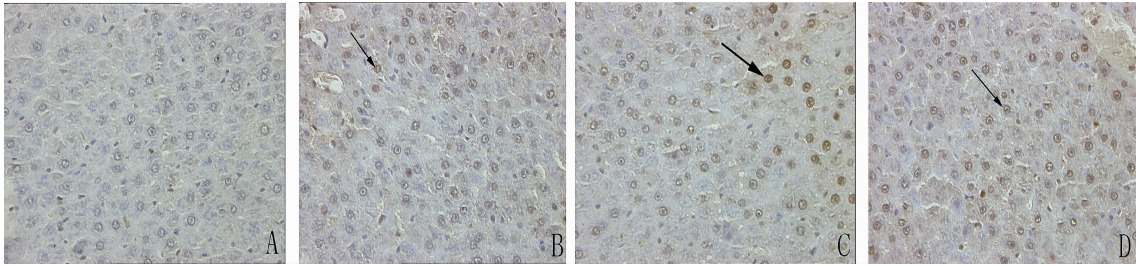
2.3 肝组织细胞凋亡的 TUNEL 分析 如图 2A 所示,对照组肝组织未见凋亡细胞。模型组 6 h 可见少许凋亡细胞(图

2B),AI 为 6.40 $\pm$ 1.43;24 h 及 48 h 时凋亡细胞较 6 h 增多(图 2C、D),AI 分别为为 29.30 $\pm$ 4.19、33.00 $\pm$ 6.99,与 6 h 比

较差异有统计学意义($F=9.92,P<0.01$)。

2.4 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平检测结果 模型组 TNF- α 与 IL-1 β 在 6 h 即达峰值,与各组比较差异有统计学意义(F 分

别为 317.57、38.64, $P<0.01$),24 h 开始下降,48 h 明显降低,与 6 h 比较差异有统计学意义(F 为 102.65、19.15, $P<0.01$),但仍高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。



A:对照组;B:模型组 6 h;C:模型组 24 h;D 模型组 48 h。

图 2 各组大鼠肝细胞凋亡检测结果(TUNEL $\times 400$)

表 2 各组血清 IL-1 β 、TNF- α 水平检测结果($\bar{x}\pm s,n=8$)		
组别	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组	22.35 $\pm$ 1.24	47.13 $\pm$ 6.51
模型组 6 h	1 275.42 $\pm$ 105.24 ^Δ	100.75 $\pm$ 14.31 ^Δ
模型组 24 h	1 128.56 $\pm$ 87.34 [*]	84.25 $\pm$ 11.74 [*]
模型组 48 h	563.47 $\pm$ 119.72 [*]	64.75 $\pm$ 8.03 ^{Δ*}

^Δ: $P<0.01$,与对照组比较;*: $P<0.01$,与模型组 6 h 比较。

3 讨 论

肝脏是机体重要的解毒器官,肝功能受损是烧伤、脓毒血症、感染性休克等多种危重疾病后续出现多器官损伤和多器官功能衰竭的重要环节,而 LPS 血症是引起肝功能损害的重要物质基础之一^[3],因此,研究 LPS 所致肝损伤后的变化特点及作用机制具有重要意义。

由于 LPS 与存在于血浆中的 LPS 结合蛋白(LBP)结合后形成可溶性的 LBP-LPS 复合体,与肝细胞表面的 CD14 受体相结合,直接作用于肝细胞,通过一系列信号转导过程激发细胞反应,产生多种生理效应和病理损害,形成对肝脏的第一次打击^[4],导致肝细胞的破坏;D-GalN 作为肝细胞磷酸尿嘧啶核苷的消耗剂,具有高度特异性,对肝脏对 LPS 的敏感性有明显的放大效应,两者综合作用肝脏后的病理表现为肝细胞弥漫性变性、坏死、炎症细胞的浸润等^[5]。本研究通过利用 LPS+D-GalN 诱导急性肝损伤,发现肝脏在 6 h 即出现变性,24、48 h 出现坏死,中心静脉扩张充血,大量炎症细胞浸润,而作为反应肝脏功能的重要指标模型组 ALT、AST 和 TBIL 在 6 h 均有升高,24 h 明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$),并达到顶峰,ALT、AST 均在 48 h 开始下降,但仍高于对照组,而 TBIL 在 48 h 仍维持高水平。这与肝细胞病变出现的时间相吻合,这也提示了肝脏是重症感染的受累器官之一,LPS 肝损伤出现早、进展快,在短期内造成肝组织严重的病理损伤,因此,早期进行保肝治疗显得尤其重要。

细胞凋亡(apoptosis)是生物体内广泛存在的由特定基因控制、以细胞 DNA 降解为特征、无明显细胞溶解的细胞自杀过程,是机体维持自身稳定的一种机制。它不仅存在于生长、发育等一般的生命过程,而且还广泛参与了许多疾病的病理机制^[6]。本实验中发现肝细胞在 LPS 作用 6 h 后就出现了凋

亡,后随着时间的推移,凋亡细胞逐渐增加,成为该急性肝损伤重要的形态学改变之一。LPS 诱导肝细胞凋亡受复制的机制调控。研究表明,TNF- α 在 LPS 肝损伤发生细胞凋亡中扮演了关键角色。Morikawa 等^[7]用 LPS+D-GalN 诱导的急性肝衰竭,结果也发现了肝细胞的大量凋亡,他们的研究发现使用抗 TNF- α 的抗体可以阻止这种凋亡的发生;且重组 TNF- α 的应用也可引起 D-GalN 致敏小鼠发生肝细胞的凋亡,由此推断 TNF- α 在肝细胞凋亡中扮演了重要的角色。Liu 等^[2]认为 LPS 诱导肝细胞凋亡在早期阶段与诱导型一氧化氮合成的酶(iNOS)基因的高表达密切相关,而在中后期则受到了 p53 基因的调控;Kuhla 等^[8]也证实细胞毒性 T 淋巴细胞(NK)释放的穿孔素(perforin),颗粒酶(granzyme)也介导了 LPS 诱导的肝细胞凋亡,在 LPS+D-GalN 诱导 6 h 可见两者的大量释放,引起细胞的凋亡明显增加。除此之外,肝脏的孕烷 X 受体(PXR)也参与了 LPS 诱导的肝细胞凋亡,在 PXR 缺失鼠促分裂素原活化蛋白(MAP)激酶活性下降,并且延长了 JAK2/STAT3 介导的信号通路的活性,引起肝细胞凋亡增加^[9]。

LPS 除可直接引起肝细胞受损外,还可引起肝脏 Kupffer 细胞(kupffer cell,KC)高度活化,使其产生、释放大量的活性介质(如 TNF- α 、IL-1、IL-6 等),形成瀑布效应,对机体形成第二次打击,进一步加重肝脏损伤^[10],此外,LPS 还能诱导还能激活 NALP3 及 NALP1 炎症小体(inflammasome),并进一步激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)-1,活化的 caspase-1 能将前 IL-1 β 和 proIL-18 分别剪切为 IL-1 β 和 IL-18,增加了 IL-1 β 的生成^[11]。TNF- α 被认为是引起这一病理过程的始动因子,对肝细胞损伤起着主导性的作用,它对肝脏既可以产生直接损伤作用,还可以通过氧化应激途径致病^[12];IL-1 β 则是重要的协同因子^[13],抑制两者的产生能明显减少 LPS 诱导的肝损伤^[14-15]。本实验进一步研究了 LPS 肝损伤后炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 变化特点,研究发现在 LPS 作用 D-GalN 致敏肝脏 6 h 后,TNF- α 和 IL-1 β 在 6 h 即达到峰值,24 h 仍维持在较高水平,48 h 虽有下降,但仍高于正常,这既符合血清 ALT、AST、TBIL 水平及肝细胞凋亡检测结果,也说明 TNF- α 、IL-1 β 在 LPS 肝损伤发生、发展中扮演了重要角色,他们的持续存在是引起了肝脏病理继续恶化的重要物质基础。由此可见,早期抑制包括 TNF- α 、IL-1 β 在内的炎症介质的生成、释放对指导临床治疗 LPS 急性肝受损具有重要的意义。

参考文献：

[1] 韩德五. 肠源性内毒素血症所致“继发性肝损伤”的临床依据[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(12): 1055-1058.

[2] Liu LM, Zhang JX, Luo J, et al. A role of cell apoptosis in lipopolysaccharide(LPS)-induced nonlethal liver injury in D-galactosamine(D-GalN)-sensitized rats[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(5): 1316-1324.

[3] Wang YY, Dahle MK, Steffensen KR, et al. Liver X receptor agonist GW3965 dose-dependently regulates LPS-mediated liver injury and modulates posttranscriptional TNF-alpha production and p38 mitogen-activated protein kinase activation in liver macrophages[J]. Shock, 2009, 32(5): 548-553.

[4] Xie GQ, Jiang JX, Chen YH, et al. Induction of acute hepatic injury by endotoxin in mice[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002, 1(4): 558-564.

[5] Mignon A, Rouquet N, Fabre Z, et al. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159(10): 1308-1315.

[6] Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. BMC Evol Biol, 2008, 8(5): 159-160.

[7] Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, et al. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxin shock model[J]. Infect Immun, 1996, 64(3): 734-738.

[8] Kuhla A, Eipel C, Abshagen K, et al. Role of the perforin/granzyme cell death pathway in D-Gal/LPS-induced in-

flammatory liver injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(5): 1069-1076.

[9] Wang K, Damjanov I, Wan YJ, et al. The inhibition of apoptosis by glycyrrhizin in hepatic injury induced by injection of lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice[J]. Lab Invest, 2010, 90(2): 257-265.

[10] Xu FL, You HB, Li XH, et al. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells[J]. Am J Surg, 2008, 196(1): 139-148.

[11] Michal G, Timea C, Bharath N, et al. Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(43): 4772-4778.

[12] Wei Z, Robert A, Roth HS, et al. Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment[J]. Toxicology, 2010, 272(1/3): 32-38.

[13] Ji Q, Zhang L, Jia H, et al. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines[J]. Ann Clin Lab Sci, 2004, 34(4): 427-436.

[14] Pathil A, Warth A, Chamulitrat W, et al. The synthetic bile acid-phospholipid conjugate ursodeoxycholylyl lysophosphatidylethanolamide suppresses TNF-alpha-induced liver injury[J]. J Hepatol, 2011, 54(4): 674-684.

[15] Cao W, Zhang W, Liu J, et al. Paeoniflorin improves survival in LPS-challenged mice through the suppression of TNF-alpha and IL-1beta release and augmentation of IL-10 production[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(2): 172-178.

(收稿日期: 2012-10-21 修回日期: 2012-11-30)

(上接第 650 页)

[3] 张琼, 陈家旭. 乳腺增生病辨证分型研究探讨[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(5): 316-317.

[4] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 131.

[5] 冯晓岚, 陈银环. 女性乳腺增生症中医证型分析[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(11): 802-803.

[6] 吴健兰, 刘璐, 高莉敏. 乳癖消治疗乳腺增生病随机对照试验的系统评价[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3): 24-27.

[7] 林毅, 唐汉钧. 现代中医乳房病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 107-109.

[8] 曲经杰, 高嵩, 马晓欣. 中药治疗乳腺增生的探讨[J]. 实用药物与临床, 2006, 9(5): 296-296.

[9] 司银套, 申贝贝, 常宁甫. 乳腺增生病中医发病机制与防治思路浅探[J]. 江苏中医药, 2011, 43(8): 3-5.

[10] 陈舒, 陈成博. 乳腺增生病的中医药治疗概况[J]. 浙江中医杂志, 2011, 46(2): 148-151.

[11] 卢家凤, 曲秀君. 红金消结胶囊治疗乳腺病的临床疗效观察[J]. 中国实用医药, 2008, 3(27): 135-136.

[12] 赵芳, 张玉洲. 乳癖散结胶囊治疗乳腺增生的 Meta 分析[J]. 中国中医药咨询, 2011, 3(15): 59-60.

[13] 房晓. 谈乳腺增生的常用药物及不良反应[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(17): 55-56.

[14] 赖熙雯, 刘晓雁, 宋兴华. 乳腺增生病中医药治疗性文献的质量评价[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(4): 405-407.

[15] 张援, 文洪宇. 通霍王消核糖浆的提取工艺研究[J]. 中国药业, 2003, 12(3): 58-58.

(收稿日期: 2012-10-22 修回日期: 2012-11-19)