论著

文章编号:1000-5404(2006)06-0594-04

黄芩甙对人肝癌BEL-7402细胞系侵袭和转移的影响

郭 昱,姚树坤 (河北医科大学第二医院消化内科,石家庄 050000)

提 要:目的 探讨黄芩甙对人肝癌BEL-7402细胞系侵袭和转移的影响及其机制。**方法** 应用细胞培养技术培养BEL-7402细胞,不同浓度黄芩甙处理肝癌细胞,通过Boyden小室模型测定其侵袭力、粘附力,细胞迁移实验测定细胞运动能力,同时观察细胞形态,流式细胞术测定肝癌细胞MMP_2、$TIMP_2$、integrin β_1、E-cd表达的改变。**结果** 黄芩甙能明显抑制肝癌细胞侵袭力、粘附力及运动能力($P<0.05$),随浓度提高作用增强。形态学观察发现,黄芩甙处理组细胞形态较圆,伪足数目较少。黄芩甙处理组MMP_2阳性表达细胞减少,$TIMP_2$阳性表达细胞增多,$MMP_2/TIMP_2$比值下降;integrin β_1表达增加,E-cd的表达则减低($P<0.05$)。**结论** 黄芩甙能抑制肝癌BEL-7402细胞侵袭与转移,其机制可能与直接抑制细胞迁移运动,抑制细胞基质溶解相关基因蛋白MMP_2表达,促进$TIMP_2$表达及抑制粘附分子E-cd的表达,促进integrin β_1表达有关。

关键词:肝细胞癌;侵袭;粘附;肿瘤转移;黄芩甙

中图法分类号:R285.5;R73-37;R735.7 **文献标识码**:A

Effect of baicalin on invasion and metastasis of human hepatocellular line BEL-7402 *in vitro*

GUO Yu, YAO Shu-kun (Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To study the effect and the mechanism of baicalin on invasion and metastasis of human hepatocellular line BEL-7402. Methods Human hepatocellular line BEL-7402 were cultured and treated respectively with 5, 10, 20 mg/L baicalin for 48 h. The invasion and adhesion of the BEL-7402 cells were examined in Boyden chamber, cell migration and morphology were also observed. The expression of MMP_2, $TIMP_2$, integrin β_1, and E-cd proteins of human hepatocellular line BEL-7402 was determined by flow cytometry. Results Baicalin inhibited invasion, adhesion and migration of hepatocellular line BEL-7402 *in vitro* in a dose dependent manner ($P<0.05$). After baicalin treatment, the expression of MMP_2 and E-cd decreased, the expression of $TIMP_2$ and integrin β_1 increased significantly, $MMP_2/TIMP_2$ ratio decreased. Morphologically, the control cells presented a feature with variously shaped pseudopods, while the baicalin treated cells kept round with relatively fewer pseudopods. Conclusion Baicalin can inhibit the invasion and adhesion of human hepatocellular line, which may result from the decease of $MMP_2/TIMP_2$ ratio, E-cd expression and cell motility, and the increase of integrin β_1 expression.

Key words: hepatocellular carcinoma; invasion; adhesion; metastasis; baicalin

侵袭和转移是恶性肿瘤的显著特点,转移是肿瘤治疗失败的主要原因。阻断肿瘤细胞的侵袭、转移是肿瘤治疗的重要途径。现代大量研究表明某些天然传统中药或其提取物具有肯定的抗肿瘤作用,通过多层次、多靶点发挥作用。黄芩甙即为其中之一。本实验观察了黄芩甙对人肝癌BEL-7402细胞株侵袭和转移的影响,并探讨其作用机制。

作者简介:郭 昱(1972-),女,河北省深县人,博士研究生,主治医师,主要从事肝癌的中药治疗方面的研究。电话:(0311)87222951

收稿日期:2005-05-30;修回日期:2005-11-26

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌BEL-7402细胞株由河北医科大学细胞室冻存;黄芩甙购自四川世坤植化有限公司;Matrigel基质为美国Becton Dickinson公司产品;Boyden小室为Coster公司产品;抗金属蛋白酶2(MMP_2)单抗及其组织抑制因子($TIMP_2$)兔多抗为北京中山生物技术有限公司产品;上皮钙粘附素(E-cd)、抗β1-整合素(integrin β_1)单抗为Santa公司产品;羊抗鼠FITC-IgG北京中山生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 人肝癌BEL-7402细胞株常规培

养于含 10% 小牛血清、100 U/L 青霉素、100 μg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。实验分为 4 组：①黄芩甙 5 mg/L 组；②黄芩甙 10 mg/L 组；③黄芩甙 20 mg/L 组；④对照组：只加培养基。药物作用 48 h，收集细胞，作以下检查，每组设 3 个副孔。

1.2.2　Boyden 小室法检测细胞体外侵袭力　　实验在 Boyden 小室中进行，上下室之间置 8 μm 微孔聚碳酸酯滤膜，膜上铺 25 μl Matrigel，胶干后，上室加预处理的细胞悬液 0.5 ml（5×10^5/室），下室加入 200 μl 培养液；5% CO_2 培养箱中培养 24 h，取出滤膜，以湿棉签小心擦除滤膜上室面的细胞；苏木精染色，随机取 5 个视野，显微镜 200 倍下计数侵袭至滤膜背面的细胞数，取均值。

1.2.3　粘附测定　　96 孔培养板覆以 Matrigel 100 μg/孔，胶干后，加入预处理的细胞悬液 50 μl（5×10^5/孔），37 ℃ 摇床 100 r/min，作用 30 min；每孔加无血清 RPMI1640 培养液 150 μl 及 MTT（1 mg/ml）50 μl，37 ℃ 继续作用 4 h；弃上清，每孔加入 100 μl DMSO 原液；10 min 后上酶标仪，在 490 nm 单波长下测定 A 值。细胞粘附率 =（试验组 A 值/对照组 A 值）×100%。

1.2.4　细胞运动能力的检测　　实验方法与体外侵袭力的检测相同，只是不在聚碳酸酯滤膜上铺 25 μl Matrige，置于培养箱中 12 h 后取出。

1.2.5　形态学观察　　将对照组与处理组细胞置于倒置显微镜下观察。

1.2.6　MMP_2、$TIMP_2$、integrin β_1、E-cd 的测定　　取单细胞悬液 1×10^6/ml，加入鼠抗人单克隆抗体工作液 0.1 ml，室温孵育 30 min，加入 PBS 10 ml 洗涤 1 次，弃上清，加入羊抗鼠 FITC-IgG 二抗工作液 100 μl，避光室温孵育 30 min，加入 PBS 10 ml，500 r/min 离心 2 min，弃上清以除去未结合的荧光二抗，上机检测前加入 PBS 0.1 ml 经 500 目铜网过滤后上机检测。采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XL Ⅱ 流式细胞仪，激发光源为 15 mW 氩离子激光器，激发波长为 488 nm，应用 Expo 32 ADC 进行免疫荧光数据分析。以均值表示蛋白含量。

1.3　统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件行 t 检验。

2　结果

2.1　黄芩甙对人肝癌细胞体外侵袭力及粘附力的影响

本研究引入 Matrigel 基质胶，模拟体外侵袭与粘附模型中细胞外基质（ECM）的作用，观察黄芩甙对肝癌细胞侵袭力、粘附力的影响。由表 1 可以看出黄芩甙组肝癌细胞侵袭力、粘附力明显下降，黄芩甙显示出显著的抗侵袭、抗粘附作用，该作用呈剂量效应关系。

表 1　黄芩甙对人肝癌细胞体外侵袭力、粘附力及迁移能力的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	黄芩甙（mg/L）	侵袭力	粘附力	迁移
对照组	0	59.87 ± 5.01	84.32 ± 6.74	68.85 ± 5.05
黄芩甙组	5	35.53 ± 3.38[a]	52.38 ± 3.83[a]	40.54 ± 3.03[a]
	10	28.87 ± 1.98[a]	35.63 ± 2.32[a]	33.36 ± 2.02[a]
	20	20.13 ± 0.78[a]	26.58 ± 1.13[a]	27.21 ± 1.01[a]

a：$P < 0.05$，与对照组比较

2.2　黄芩甙对人肝癌细胞迁移能力的影响

由表 1 可见，黄芩甙 5、10、20 mg/L 处理组细胞迁移能力均较对照组显著降低（$P < 0.05$）。

2.3　黄芩甙对人肝癌细胞形态的影响

对照组表现出成纤维细胞样形态，伸出形态各异的伪足，而黄芩甙组细胞形态较圆，伪足数目相对较少。

2.4　黄芩甙对人肝癌细胞 MMP_2、$TIMP_2$、integrin β_1、E-cd 表达的影响

如表 2 所示：对照组 MMP_2、$TIMP_2$ 表达分别为（527.49 ± 20.16）、（271.78 ± 16.53），$MMP_2/TIMP_2$ 比值为 1.94；黄芩甙作用后 MMP_2 表达随黄芩甙剂量的增大而降低，$TIMP_2$ 表达则呈现出上升趋势，$MMP_2/TIMP_2$ 比值下降，黄芩甙 5 mg/L 组 $MMP_2/TIMP_2$ 比值 1.16 接近 1，10 mg/L 组 $MMP_2/TIMP_2$ 比值逆转为 0.92。黄芩甙组细胞 integrin β_1 表达较对照组降低，E-cd 的表达则增加，黄芩甙 5 mg/L 组即呈现上述显著变化（$P < 0.05$），10 mg/L 组、20 mg/L 组与 5 mg/L 组比 integrin β_1、E-cd 的表达呈量效关系。

表 2　黄芩甙对人肝癌细胞 MMP_2、$TIMP_2$、integrin β_1、E-cd 表达的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	黄芩甙（mg/L）	MMP_2	$TIMP_2$	$MMP_2/TIMP_2$	integrin β_1	E-cd
对照组	0	527.49 ± 20.16	271.78 ± 16.53	1.94	407.54 ± 20.58	251.72 ± 12.34
黄芩甙组	5	389.68 ± 24.12[a]	333.97 ± 12.24[a]	1.16[a]	354.07 ± 18.17[a]	335.50 ± 20.18[a]
	10	324.42 ± 18.16[a]	352.73 ± 12.15[a]	0.92[a]	319.44 ± 15.21[a]	376.45 ± 22.36[a]
	20	305.19 ± 15.28[a]	379.87 ± 15.36[a]	0.80[a]	291.49 ± 12.88[a]	393.84 ± 25.68[a]

a：$P < 0.05$，与对照组比较

3　讨论

肿瘤细胞的侵袭与转移是恶性肿瘤的基本特征之一，尤其是在肿瘤发展的最后阶段，控制转移是决定患者预后的关键因素。目前认为恶性肿瘤的侵袭能力在其恶性转化的早期即可获得，部分肿瘤随着病情进展，其侵袭能力还有逐渐增强的趋势，粘附和侵袭的过程增加了恶性肿瘤的增殖和转移能力。如何阻断癌细胞的侵袭与转移，实现带瘤生存是目前肿瘤治疗研究的热点之一，已有研究表明某些中草药具有抑制肿瘤侵袭与转移的作用。黄芩甙是从唇形科植物黄芩中提取、分离出来的一种黄酮类化合物，是黄芩的主要有效成分之一，具有解热、降压、利胆、保肝、镇静、抗菌等药理作用。近年来随着国际上对黄芩甙研究的持续升温以及认识的逐步深入，发现黄芩甙具有抗肿瘤作用，表现为抑制癌细胞增殖，促进癌细胞凋亡，呈剂量依赖关系[1,2]。我们体外观察了黄芩甙对肝癌细胞侵袭、粘附及转移的影响，发现黄芩甙在抑制肝癌细胞粘附、侵袭、转移方面具有显著作用，其机制可能与影响某些基质金属蛋白酶及粘附分子的表达有关。

癌的侵袭与转移是一个多因素、多步骤、多阶段的

复杂过程[3]，按 Liotta 等[4]提出的癌细胞侵袭、转移的3步假说，从分子水平将这个过程分为：①粘附；②降解；③运动。其中细胞外基质（ECM）的降解和基底膜的破坏是一个关键步骤，ECM 是肿瘤侵袭和转移的天然屏障，Scrapers 等发现 ECM 中断或缺失的膀胱上皮癌患者5年生存率显著低于基底膜完整者，肿瘤的临床分期与基底膜的完整性密切相关。肿瘤细胞通过自身或诱导宿主细胞产生多种基质蛋白溶解酶，如基质金属蛋白酶（MMP）、纤溶酶原激活物、胱氨酸蛋白酶等。其中 MMP 家族是其中关键因素之一。在肿瘤组织中，肿瘤细胞和基质细胞均可表达并分泌 MMP，导致 ECM 的降解，然而 MMP 的活性受其组织抑制因子（TIMP）调节，TIMP、MMP 之间存在着动态平衡，二者按 1∶1 化学比形成非共价牢固结合，从而抑制 MMP 活性，使机体内的 ECM 的代谢更新处于动态平衡中[5]。一旦调节失控，MMP-TIMP 的蛋白水解平衡向 MMP 转变，就成为肿瘤细胞侵袭和转移的重要条件。MMP_2、$TIMP_2$是这两个家族中具有代表性的两个因子[6]。我们的研究发现黄芩甙能明显抑制人肝癌细胞的体外侵袭能力，使 MMP_2表达下降，$TIMP_2$表达上升，$MMP_2/TIMP_2$比值下降。提示黄芩甙通过影响肝癌细胞基质降解相关蛋白 MMP_2和 $TIMP_2$表达及其 $MMP_2/TIMP_2$比值，而达到抑制癌细胞侵袭的作用。

恶性肿瘤细胞在侵袭和转移过程中，与宿主组织成分发生多次粘附。新近资料表明，这一现象与细胞粘附分子的作用有密切关系[7]。其中引人注目的是钙粘附素、整合素家族成员[8]。钙粘附素主要介导正常和肿瘤组织中细胞与细胞间的粘附。E-cd 属钙粘附素超家族经典Ⅱ族成员，依赖细胞外 Ca^{2+}介导同种亲和性的细胞与细胞间的粘附，在相邻细胞间形成钙粘附拉链，参与建立和维持细胞间连接，在同种细胞间起着相互联系、相互制约的作用。它的表达程度及功能活性直接影响着细胞的脱离和再附着。多数学者认为，如果 E-cd 介导的粘附功能受损或表达减少，肿瘤细胞连接松散，易脱落。许多癌组织中均出现 E-cd 的表达缺失或基因突变[9]。某些恶性肿瘤导入 E-cd 基因后，能明显降低肿瘤细胞侵袭和转移的能力。Kuefer 等[10]首先报道了在进展期和伴有转移的前列腺癌患者血清中 E-cd 明显升高，其可作为预测肿瘤进展和转移的指标。integrin β_1是由 α、β 亚单位通过二硫键形成的二聚体跨膜蛋白，可以同时与细胞基质成分及细胞骨架结合而形成配体－integrin β_1－细胞骨架跨膜信息系统，介导肿瘤细胞的粘附和转移。Fujita 等研究了包括肝癌在内的27种癌细胞系，结果表明全部细胞均不同程度的表达 integrin β_1。Strobel 等[11]的实验研究表明阻断卵巢癌 integrin β_1可以有效抑制肿瘤的腹膜播散。Reinmuth 等将 integrin β_1的抗体用于结肠癌肝转移鼠原位模型，发现能显著抑制结肠癌肝转移灶的形成，及转移灶的血管生成。褚忠华等[12]研究表明肝癌多种粘附分子基因 m-RNA 表达量与肿瘤大小、有无转移，结节数目有关，E-cd 与肿瘤大小、有无转移，结节数目呈负相关，integrin β_1与之呈正相关。本研究结果表明黄芩甙具有抗肝癌细胞粘附的作用，同时发现黄芩甙处理组 E-cd 表达增多、integrin β_1表达下降，认为黄芩甙通过促进 E-cd 表达，抑制 integrin β_1表达而使癌细胞间连接紧密，避免了癌细胞从原发灶处的脱落、游离，达到抑制肿瘤侵袭、转移的作用。这可能是其抑制肿瘤侵袭、转移的机制之一。

另外，有研究表明整合素可以调控基质金属蛋白酶的生成和活性。Brooks 等发现 integrin β_1与 MMP_2共同定位于血管生成细胞表面和黑色素瘤细胞的表面，MMP_2直接联接于 integrin β_1上。在乳腺癌细胞中共同表达 MT1-MMP 和 integrin β_1可明显加强 MMP_2的自动催化成熟。本研究显示肝癌细胞对照组具有高表达的 integrin β_1与 MMP_2，黄芩甙作用后二者的表达均降低，表明二者具有协同作用，验证了上述结果。

肿瘤细胞的运动性在侵袭转移过程中的作用已被众多实验所证实，运动能力与侵袭之间的关系呈正相关[13,14]。在肿瘤转移过程中的某些阶段，它表现出较强的运动能力。如肿瘤细胞从原发瘤灶分离并侵入邻近组织以及再穿过血管壁进入血循环和穿出血管壁进入继发部位等。1979 年 Roos 等将瘤细胞接种到门静脉内，观察了瘤细胞在肝内侵袭过程的超微结构变化。他们观察到瘤细胞在肝内的侵袭过程有3个起始步骤：①瘤细胞伸出伪足，进入内皮细胞，内皮细胞形成一个小的隔离；②瘤细胞的伪足深入内皮细胞，使内皮细胞形成一个开口；③瘤细胞穿过内皮细胞又形成一个大的突起伪足，呈锯齿状与肝细胞接触，进而增殖形成小的瘤细胞灶。肿瘤细胞的运动能力与细胞形态尤其是伪足密切相关。本试验中未处理组肝癌细胞表现出纤维母细胞样形态，伪足数目不等；经黄芩甙处理组细胞形态较圆，伪足数目也较少，过河实验显示黄芩甙处理组较未处理组运动能力明显下降，这可能是黄芩甙抑制肝癌细胞转移的机制之一。

参考文献：

[1] DONG Y, YANG M M, KWAN C Y. *In vitro* inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs[J]. Life Sci, 1997, 60(8): PL135－PL140.

[2] MATSUZAKI Y, KUROKAWA N, TERAI S, *et al*. Cell death in-

duced by Baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(2): 170-177.
[3] YOKOTA J. Tumor progression and metastasis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(3): 497-503.
[4] LIOTTA L A. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture[J]. Cancer Res, 1986, 46(1): 1-7.
[5] ZUCKER S, CAO J, CHEN W T. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment[J]. Oncogene, 2000, 19(56): 6642-6650.
[6] FAN Y Z, ZHANG J T, YANG H C, *et al*. Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 1138-1143.
[7] HAZAN R B, QIAO R, KEREN R, *et al*. Cadherin switch in tumor progression[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1014: 155-163.
[8] SUN J J, ZHOU X D, LIU Y K, *et al*. Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1999, 125(1): 28-34.
[9] CARCIA S, MARTINI F, DE MICCO C, *et al*. Prognostic value of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma[J]. Ann Pathol, 1998, 18(2): 98-102.
[10] KUEFER R, HOFER M D, GSCHWEND J E, *et al*. The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17): 6447-6452.
[11] STROBEL T, CANNISTRA S A. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro*[J]. Gynecol Oncol, 1999, 73(3): 362-367.
[12] 褚忠华, 闵 军, 凌云彪, 等. 多种粘附分子基因在原发性肝癌的表达及其临床意义[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(9): 1672-1676.
[13] BISCHOF P, MEISSER A, CAMPANA A. Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 943: 157-162.
[14] 陈思远, 高国栋, 黄 韬. 体外腺病毒介导的HSV-tk/GCV对产生AFP的人肝癌细胞的影响[J]. 消化外科, 2002, 1(1): 25-29.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2006)06-0597-01

个案与短篇

烧伤并发胰腺炎1例

胡炯宇,黄跃生,刘旭盛,郑 霖,高维东 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

烧伤后急性胰腺炎的发病率约0.07%,病因尚未完全明了。可能与缺血缺氧、炎症反应导致胰管水肿阻塞,胰管上皮因内压升高受损,胰酶消化胰组织[1],或与肠道菌群移位和重定植相关[2]。血清淀粉酶高于500 U/dl,尿淀粉酶明显升高(正常值40~180 U/dl)即提示本病,结合症状、腹部B超和(或)CT可确诊。我科收治1例特重烧伤患者,伤后4个月并发胰腺炎,现报告如下。

1 病例资料

患者,男,32岁,热钢渣烫伤全身多处,在外院初治2 d后于2004年5月13日转入我院。查体:烧伤面积约95%(其中深Ⅱ度15%,Ⅲ度80%),合并重度吸入性损伤。因自体皮源匮乏先后行清创植皮术共11次。此期间相继发生严重创面感染,应激性糖尿病和双下肢深浅静脉血栓,治疗后好转。2004年9月27日行第12次植皮术,术中顺利,术后出现低体温(34.4 ℃)、间歇性呼吸困难。测血压110/75 mmHg,心率142次/min,呼吸30次/min。予以保温措施,吸痰并灌洗呼吸道后,呼吸困难缓解,体温升至37.1 ℃,但血压降至100/67 mmHg。快速输入胶体3 600 ml(其中血浆1 400 ml,全血1 200 ml)后患者血压稳定至106~108/62~65 mmHg。次日清晨患者呕吐胃内容物1次,为黄色带酸味物质,量少。诉腹胀,无压痛反跳痛。予以吗叮啉、养胃舒口服。以后3 d患者,仍觉腹胀,3次呕吐胃内容物,量20~30 ml/次,性质同前。10月2日清晨诉剑突下隐痛,持续时间约1 min。急查血尿淀粉酶示:尿AMS 3 832.4 IU/L,血AMS 677.0 IU/L,腹部B超未见异常。考虑胰腺炎可能。禁食水,予以654-2 20 mg肌注,1/d,洛赛克40 mg静注,2/d,施他宁3 mg加入生理盐水50 ml中静脉泵维持1/2 h,同时补钾、维持水电解质平衡,监测血尿淀粉酶。15 d后复查血淀粉酶正常,尿淀粉酶稍高。开始进食少量流质,此后血淀粉酶一直波动在159.81~352.01 IU/L,尿淀粉酶872.61~1476.21 IU/L。期间患者偶感剑突下隐痛,持续30 s至1 min,症状与血尿淀粉酶高低无关。同时患者消瘦明显,创面受压严重。间断输入血浆和全血、应用生长激素,12月20日复查血尿淀粉酶正常。2005年1月14日行第14次植皮术,术后患者觉腹胀,无腹痛、呕吐,查血淀粉酶2 711.4 IU/L,CT检查示:胰腺体积正常,边缘清晰,体尾部少量渗出。考虑胰腺炎复发,予以胃肠减压,严格禁食水,维持电解质平衡,监测血尿淀粉酶。5 d后复查血淀粉酶342.8 IU/L。2月4日开始在淀粉酶监测下进食少量流质饮食,未见淀粉酶升高,此后胰腺炎未再复发。继续治疗后痊愈出院。

(下转600页)

作者简介:胡炯宇(1981-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事烧伤早期脏器功能损伤方面的研究。电话:(023)60956132
通讯作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:yshuang@pubic.cta.cq.cn
收稿日期:2005-10-20;修回日期:2006-01-01