文章编号：1000-5404(2008)13-1275-04

论著

Skp2 shRNA 表达质粒的构建及其对肺癌细胞生长的影响

李　胜，梅同华，黎　联，张明川　（重庆医科大学附属第二医院呼吸内科，重庆 400010）

摘　要：目的　构建 Skp2 基因的 RNAi 真核表达质粒，观察其对 SPC-A-1 肺癌细胞内 Skp2 基因表达及细胞生长的影响。**方法**　根据 GenBank 中 Skp2cDNA 序列设计针对 Skp2 基因的 shRNA 序列，合成序列并克隆入 pGenSil-1 质粒中，构建 Skp2 pshRNA 重组质粒。脂质体介导重组质粒转染 SPC-A-1 肺癌细胞。RT-PCR 检测肺癌细胞 Skp2 mRNA 的表达，Western blot 检测 Skp2 蛋白表达。MTT 检测各组细胞生长情况，流式细胞仪检测细胞周期改变。**结果**　重组质粒经酶切鉴定和测序，证实表达干扰质粒构建成功。转染重组质粒的肺癌细胞 Skp2 mRNA 和蛋白的表达明显下降（$P<0.05$），细胞生长增殖受到抑制，阻滞在 G_0/G_1 期的细胞比例增加，而进入 S 期的细胞比例明显下降（$P<0.05$）。**结论**　构建的 Skp2 shRNA 表达质粒能有效下调 Skp2 基因的 mRNA 及蛋白的表达、抑制细胞的生长增殖。

关键词：Skp2 基因；RNA 干扰；短发夹 RNA；肺癌细胞
中图法分类号：R394-33；R730.23；R734.2　　**文献标识码：**A

Construction of Skp2 shRNA and its effect on lung cancer cell growth

LI Sheng, MEI Tong-hua, LI Lian, ZHANG Ming-chuan (Department of Respiratory Diseases, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective　To construct and identify the RNAi eukaryotic vector of Skp2 gene and to observe its interfering effect on the growth of SPC-A-1 lung cancer cells. Methods　The specific shRNA sequence was designed and synthesized according to the Skp2 cDNA sequence in GenBank. The sequence was cloned into plasmid pGenesil-1. Then recombinant vector was transfected into SPC-A-1 lung cancer cells by Lipofectamine 2000. The expressions of Skp2 mRNA were analyzed by RT-PCR and the levels of Skp2 protein were detected by Western blot. The cell growth suppression was analyzed by MTT assay. Distribution of cell cycle was assessed by flow cytometry. Results　The sequence of template and specific siRNA was correct by sequence analysis. Obvious decrease was observed in the levels of Skp2 mRNA and Skp2 protein after Skp2 shRNA transfection ($P<0.05$). The subcloned recombinant plasmid expressing Skp2 shRNA effectively inhibited lung cancer cell growth, while empty plasmid had no such specific effect ($P<0.05$), induced cell cycle arrest in G_0/G_1 phase with a significant decrease of cells in S phase ($P<0.05$). Conclusion　The successful construction of Skp2 shRNA vector, which could effectively abate the expression of Skp2 and inhibit the growth of SPC-A-1 lung cancer cells, laid the foundation for further study on the function of Skp2 gene and gene therapy of lung cancer.

Key words: Skp2 gene; RNA interference; small hairpin RNA; lung cancer cell

Skp2（S-phase kinase associated protein）是近年发现的一种与细胞周期调控紊乱密切相关的可疑癌基因，通过加速细胞周期负性调控因子的泛素化降解，促进细胞从 G_1 期向 S 期的转换，在肿瘤发生、发展中发挥重要作用[1,2]。研究表明 Skp2 在许多恶性肿瘤中高表达，与肿瘤的恶性程度及预后密切相关，但其在肿瘤发生、发展中的作用机制仍不清楚[3-5]。目前 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）被广泛地运用在基因功能及肿瘤治疗的研究，通过在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默，为基因功能研究提供了一个快速、简便的方法[6]。本研究基于 Skp2 在肿瘤中的高表达，以其为靶点，通过采用 RNA 干扰技术抑制其在肺癌细胞中的表达，探讨对肺癌细胞的生长的影响。前期研究显示 SPC-A-1 肺癌细胞内 Skp2 基因高表达（实验结果未发表），因此本课题依据 RNA 干扰原理，使用 RNAi-DNA 干扰技术，设计、构建针对靶点 Skp2 基因的 shRNA 重组质粒载体，转染至 SPC-A-1 肺癌细胞，观察 Skp2 shRNA 重组质粒载体对肺癌细胞内源性 Skp2 基因及蛋白的表达情况、细胞生长增殖的影响，探索肿瘤

作者简介 李　胜，男，重庆市人，博士研究生，主治医师，主要从事肺癌分子机制及治疗方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)68373561，E-mail：zhls9898@163.com
通信作者 梅同华，电话(0791)6996333，E-mail：zhls9898@163.com
收稿日期 2007-05-10　修回日期 2007-12-05

治疗的新策略,为进一步实验提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验主要材料

pGenSil-1(含 U6 启动子和 EGFP)质粒、大肠杆菌 *E. coil* DH5α 由武汉晶赛生物工程技术公司提供。SPC-A-1 肺癌细胞购于上海细胞库。限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ、T_4 连接酶、T_4 DNA 聚合酶、*Taq* 酶、DNA 片段纯化试剂盒均为 TaKaRa公司产品。小量质粒提取试剂盒为中鼎试剂公司产品。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。编码针对 Skp2 的 siRNA 寡聚 DNA 由上海生物工程技术有限公司合成。RNA 提取试剂盒及 RT-PCR 试剂盒为 TaKaRa 公司产品。一抗分别为兔抗人 Skp2 抗体,β-actin 抗体,二者均为 Santa Cruz 公司产品;二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体为北京中山产品。引物均由上海生物工程公司合成。

1.2 质粒的构建

1.2.1 含 Skp2 靶序列的短 dsDNA 分子的获得 根据 GenBank 中人 Skp2 基因的核苷酸序列(NM_005983),按照 shRNA 的设计原则,设计合成 2 对含 Skp2 的 2 条反向重复多聚核苷酸序列和 1 对对照序列。Skp21 的目标序列为:AAGAGGAGCCCGACAGTGAGA;正义、反义序列分别 5′-GAGGAGCCCGACAGTGAGA-3′和 5′-TCTCCTCGGGCTGTCACTC-3′;Skp22 的目标序列为:AAGAGCAAAGGGAGTGACAAA;正义、反义序列分别 5′-GAGCAAAGGGAGTGACAAA-3′和 5′-CTCGTTTCCCTCACTGTTT-3′;对照 HK 的序列为:GACTTCATAAGGCGCATGC 正义、反义序列分别 5′-GACTTCATAAGGCGCATGC-3′和 5′-CTGAAGTATTCCGCGTACG-3′正义、反义链之间被 TTCAAGACG 回折序列分开,在之后由 6 个“T”构成,为 RNA 聚合酶Ⅲ的终止子,分别带有 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切位点,终止信号后带有 *Sal* Ⅰ的酶切位点,行 BLAST 进行同源搜索,确定其为特异性序列。

1.2.2 重组质粒的构建与鉴定 两条多聚核苷酸片段在退火缓冲液中 95 ℃热冲击 30 min,70 ℃热冲击 10 min,然后自然冷却至 30 ℃,便得到退火双链 DNA 分子。将退火双链 DNA 分子用 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ进行酶切后,目的片段与线性化的空载质粒 pGenSil-1 连接。将连接好的质粒转化大肠杆菌 DH5a,用含氨苄霉素的平板筛选,挑选阳性菌落送测序和酶切鉴定。重组质粒分别命名为:pshRNA-HK、pshRNA-SKP21 和 pshRNA-SKP22。

1.3 用脂质体转染 SPC-A-1 细胞

SPC-A-1 肺癌细胞常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,培养条件为 37 ℃、5% CO_2,细胞增至 80% 汇合时进行转染。用无血清、无抗生素培养基 50 μl 分别稀释质粒和 Lipofectamine 2000 脂质体,重组质粒质量与脂质体体积比例为 1∶3,将重组质粒转染 SPC-A-1 肺癌细胞,培养 4 h 后换为完全培养基,72 h 后用抗生素 G418(800 μg/ml)筛选,每周换液两次,2 周后再以 200 μg/ml 维持量扩大培养,取阳性克隆细胞扩增并保存。荧光显微镜下观察 SPC-A-1 肺癌细胞绿色荧光表达情况。

1.4 RT-PCR 检测 Skp2 mRNA 含量

根据 Skp2 基因序列,设计其特异性引物:上游引物 5′-GACAGTGAGAACATCCCCC-3′,下游引物 5′-GAGAGACAGTATGCCGTGGA-3′,产物为 470 bp;内参引物:上游引物 5′-CCTGAAGTACCCCATCGAGCAC-3′,下游引物 5′-ATACCCCTCGTAGATGGGCACA-3′,产物大小为 309 bp。收集转染 G418 筛选 2 周后及未转染的 SPC-A-1 肺癌细胞,按 Trizol 操作说明书提取细胞总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书检测 Skp2 mRNA 含量。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统扫描鉴定。

1.5 Western blot 检测 Skp2 蛋白表达

收集细胞,按分子克隆方法提取细胞总蛋白,用 Bradford 法定量。取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE,250 mA 恒流电转移至 PVDF 膜上,加入按 1∶500 稀释的一抗,孵育过夜,TBST 洗膜后加入 1∶2 000 浓度稀释的二抗,37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜后,化学发光法(ECL)显色。运用 Bio-Rad 公司的 Quantity one 软件对 Western blot 结果进行图像分析。

1.6 细胞生长曲线(MTT 实验法)

分为 4 组进行实验:无质粒的阴性对照组 Skp2shRNA-neg、Skp2 shRNA-HK 组、Skp2 shRNA-1 组,Skp2 shRNA-2 组,每组 6 孔,将细胞计数后以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中。将培养板移入 CO_2 孵箱中,在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养,每日取 1 块板,连续检测 7 d。每孔加入噻唑蓝溶液(MTT,浓度为 0.5 g/L)溶液 20 μl,继续孵育 4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO),酶标仪 490 nm 吸光度读取数值[*D*(490)]。以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。重复实验 3 次。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期相分布

肺癌细胞经处理后,收获 2×10^6 个细胞,PBS 洗涤,70% 冰乙醇固定,加入 500 μg/ml 的碘化丙啶(PI)和 10 mg/ml 的 RNA 酶 A,37℃ 避光染色 30 min,流式细胞仪自动检测出每个细胞所处的细胞周期,并分别计算出 G_0/G_1 期、S 期细胞所占的百分比。每组重复实验 3 次。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒经 *Sal* Ⅰ酶切出 1 条约 400 bp 的 DNA 片段,与理论值相符,测序结果与设计的 DNA 片段序列完全一致,表明质粒重组构建成功。

2.2 重组质粒测序鉴定

3 组质粒 SKP21、SKP22、HK 经测序,结果显示与设计 DNA 片段完全一致,结果完全符合设计要求。

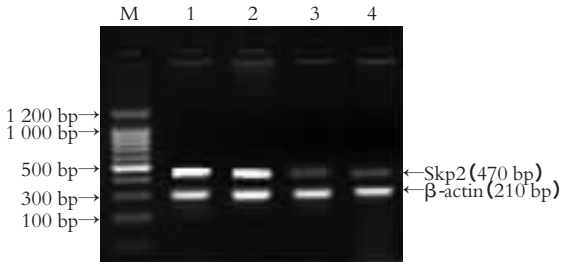
2.3 重组质粒转染 SPC-A-1 肺癌细胞

重组质粒转染肺癌细胞,经过 2 周的 G418 筛选,镜下可见大部分细胞形成表达绿色荧光的阳性克隆株,表明重组质粒已成功转染 SPC-A-1 肺癌细胞。

2.4 RT-PCR 分析 Skp2 mRNA 的表达

RT-PCR 检测 SPC-A-1 细胞转染前后 Skp2mRNA 的表达,结果显示,pshRNA-SKP21、pshRNA-SKP22 组的 Skp2 电泳带较 pshRNA-HK 组和未转染组明显减弱。其中 pshRNA-SKP21、pshRNA-SKP22 组的抑制效率分别达(74 ± 5)% 和(80 ± 3)%

（图 1）。表明 Skp2 shRNA 能有效抑制 Skp2 mRNA 的表达。

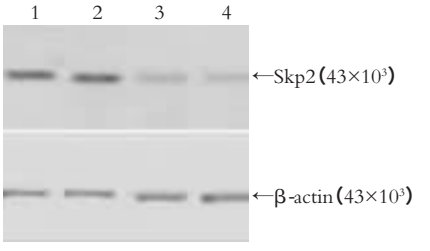


M 标准；1：未转染质粒的 SPC-A-1 肺癌细胞组；2：转染 pshRNA-HK 质粒肺癌细胞组；3：转染 pshRNA-Skp21 质粒肺癌细胞组；4 转染 pshRNA-Skp22 质粒肺癌细胞组

图 1　pshRNA-Skp2 对 SPC-A-1 细胞 Skp2 mRNA 表达的影响

2.5　Western blot 分析 SPC-A-1 肺癌细胞内源性 Skp2 蛋白表达

应用 Western blot 技术，以 β-actin 为内参，测定免疫印迹相应蛋白条带的光密度值，比较实验组与对照组、未转染组间肺癌细胞内 Skp2 基因在蛋白表达水平的差异。结果显示：各组间的 β-actin 表达无差异（$P>0.05$），表明各组间的上样量基本一致，pshRNA-Skp21、pshRNA-Skp22 组与对照组 pshRNA-HK 及未转染组相比，肺癌细胞内 Skp2 蛋白的表达明显下降，其抑制率分别为（65 ± 5）%、（70 ± 5）%（图 2）。表明 Skp2 shRNA 表达载体构建成功，能有效沉默 Skp2 蛋白的表达。



1 未转染质粒的 SPC-A-1 肺癌细胞组；2：转染 pshRNA-HK 质粒肺癌细胞组；3：转染 pshRNA-Skp21 质粒肺癌细胞组；4：转染 pshRNA-Skp22 质粒肺癌细胞组

图 2　pshRNA-Skp2 对 SPC-A-1 细胞蛋白表达的影响

2.6　细胞生长曲线

经 MTT 检测，转染了 Skp2shRNA-1、Skp2shRNA-2 质粒的 SPC-A-1 肺癌细胞生长明显慢于未转染质粒及转染阴性对照质粒的 SPC-A-1 细胞，细胞生长受抑（图 3）。

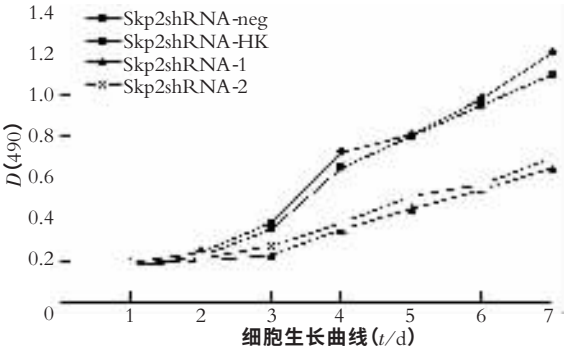


图 3　shRNA 质粒载体对 SPC-A-1 肺癌细胞生长的影响

2.7　RNAi 技术对 SPC-A-1 细胞周期的影响

流式细胞仪分析结果显示，pshRNA-Skp21 和 pshRNA-Skp22 转染组与未转染和转染 pshRNA-neg 的 SPC-A-1 组相比，G_0/G_1 期所占比例增加，而 S 期细胞所占比例减少，差异均有统计学意义（$P<0.05$），未转染和转染 pshRNA-HK 的 SPC-A-1 组之间无显著差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　shRNA 质粒载体对 SPC-A-1 肺癌细胞细胞周期的影响[（$\bar{x}\pm s$）%]

组别	G_0/G_1	S
对照组	56.5 ± 2.3	30.5 ± 2.2
pshRNA-HK	55.3 ± 2.1	29.4 ± 2.1
pshRNA-Skp21	67.3 ± 2.5[a]	22.4 ± 1.5[a]
pshRNA-Skp22	69.4 ± 2.2[a]	20.3 ± 1.6[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

shRNA 表达载体是近年来被广泛采用的一种 RNAi 质粒载体，能在细胞外构建合成[7]。本研究中所采用 shRNA 表达载体为 pGenSil 线性化质粒载体，产生的含发夹状结构的 siRNA，能特异性地与目的基因 mRNA 相结合，引发对应的基因沉默或表达抑制。因其能通过质粒载体整合到真核基因组中，能在真核细胞传代表达，产生的干扰效果持续，因此适用于长时间的干扰研究，解决了以往化学方法构建的质粒在细胞内存在时间短的问题。

在 RNAi 实验中，并非每一段序列作为靶点都能够获得较好的基因干扰效果，因此靶点序列的选择非常重要[8]。本研究针对不同目的序列设计了 2 对，研究结果显示 Skp2 基因的 mRNA 表达下降，蛋白表达也明显受抑制，表明实验构建针对肺癌细胞 Skp2 基因 2 条 shRNA 的质粒表达载体序列的选择是有效的。

肿瘤是一种细胞周期调控紊乱性疾病，其根本原因在于细胞的正性因子表达增强或负性因子表达减弱，导致细胞过度生长、分裂，出现细胞生长失控。泛素蛋白酶体途径通过降解细胞周期调控因子参与对细胞周期的调控，在调节细胞周期调控因子平衡方面发挥着重要作用，与肿瘤的发生、发展密切相关[9]。Skp2 属于泛素蛋白酶体系统的组成部分，通过对细胞周期调控因子的降解参与对细胞周期的调控，是一种与细胞周期调控关系密切的癌基因。Skp2 具有识别特异性蛋白底物并引导进入泛素蛋白酶体降解的特性，通过其特异性接头将各种底物蛋白（尤其是 CKI）招募到泛素化复合体进行泛素化降解而参与细胞周期的调控，促进其泛素化降解，是推动细胞从 G_1 期进入 S 期的重要调控蛋白。Skp2 在肿瘤的发生、发展中扮演着重要角色，在许多肿瘤中高表达，与肿瘤发生、发展、侵袭性、预后关系密切[10]。Yokoi 等[5] 研究发现 Skp2 在小细胞肺癌组织中过度表达，应用 Skp2 反义

寡核苷酸使之表达水平下调，结果发现细胞增殖明显受抑，说明 Skp2 可能在小细胞肺癌的细胞增殖中发挥重要作用。

本研究表明，SPC-A-1 肺癌细胞内 Skp2 高表达，通过采用 RNAi 技术，构建针对 Skp2 基因特异性的 shRNA 干扰质粒。通过 RT-PCR、Western blot 技术检测肺癌细胞内 Skp2 mRNA 基因表达及蛋白表达情况，在转染干扰质粒后细胞内 Skp2 基因及蛋白表达在表达均有明显下降，表明构建的质粒能在基因水平上有效的抑制 Skp2 基因的表达。本实验通过流式细胞仪技术和 MTT 检测了 RNAi 技术抑制 Skp2 基因的表达对细胞周期和细胞增殖的影响：S 期细胞百分比明显下降，更多的细胞被阻滞在 G_0/G_1 期，细胞的生长受到抑制。提示 Skp2 与肺癌细胞的生长、增殖呈正相关，而抑制其表达能抑制细胞生长，与 Nelsen 等[11,12]的研究结果相符。其可能机制在于 Skp2 通过参与对细胞周期检查点的调控，促进细胞周期负性调节因子如 P27 蛋白的泛素化降解，从而加速 S 期进程，对细胞增殖有正性推动作用。通过 RNAi 技术抑制 Skp2 基因的表达后，P27 蛋白水平在细胞内得以蓄积，使细胞阻滞在 G_0/G_1 期，进入 S 期的细胞减少，从而抑制了细胞的生长增殖活性。

这一研究结果为今后进一步研究 Skp2 基因对细胞生物行为的影响及其在肿瘤发生、发展中的作用机制提供了一个有效的方法，并有望成为肺癌基因治疗的一个重要手段。

参考文献：

[1] Hao B, Zheng N, Schulman B A, *et al*. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase[J]. Mol Cell, 2005, 20(1): 9 - 19.

[2] Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, *et al*. Inverse correlation between expression levels of p27 and the ubiquitin ligase subunit Skp2 in early esophageal squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2004, 24(2B): 777 - 783.

[3] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, *et al*. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(9): 5043 - 5048.

[4] Yokoi S, Yasui K, Mori M, *et al*. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes[J]. Am J Pathol, 2004, 165(1): 175 - 180.

[5] Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, *et al*. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers[J]. Am J Pathol, 2002, 161(1): 207 - 216.

[6] Semizarov D, Frost I, Sarthy A, *et al*. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(11): 6347 - 6352.

[7] 辛海明，刘泽军，陈 杰. iASPP 特异性 RNAi 表达载体的构建及其干扰效果鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 900 - 902.

[8] Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 497 - 500.

[9] Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, *et al*. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2005, 41(2): 105 - 116.

[10] Harada K, Supriatno, Kawaguchi S, *et al*. High expression of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) is a strong prognostic marker in oral squamous cell carcinoma patients treated by UFT in combination with radiation [J]. Anticancer Res, 2005, 25(3c): 2471 - 2475.

[11] Nelsen C J, Hansen L K, Rickheim D G, *et al*. Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and Skp2[J]. Oncogene, 2001, 20(15): 1825 - 1831.

[12] Masuda T A, Inoue H, Sonoda H, *et al*. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via P27 proteolysis[J]. Cancer Res, 2002, 62(13): 3819 - 3825.

（编辑 王小寒）

（上接 1271 页）

苡仁 24 g、厚朴 12 g、通草 6 g、滑石 24 g、法夏 12 g、淡竹叶 18 g、太子参 45 g、大黄 12 g、芒硝 15 g(冲服)、枳实 18 g、郁金 24 g、茵陈 24 g、栀子 12 g。

2 结果

患者服此方 1 剂后，自觉腹痛及皮肤瘙痒减轻，有便意但仍未通，口干亦好转，故上方继用，患者服第 2 剂后，大便通畅，腹痛若失，精神明显好转，且能进食，苔黄微腻，脉滑，上方去大黄、芒硝，加茯苓、连翘，服 1 周后复查，血糖降为 8 mmol/L，患者自觉无不适感出院。

3 讨论

从西医来看，此例患者既有糖尿病，又考虑胰腺炎，但以中医的辨证来看，其病机为湿热内阻，气机不畅，内结阳明，腑实不通而致以上诸症，因六腑以通为用，故予三仁汤、茵陈蒿汤、大承气汤加减治疗，致使“通而不痛”，而当患者大便畅通后，则不宜再予大黄、芒硝攻下之品，但仍以清热退黄，健脾化湿为法而收全功。

中医对急症的治疗[1]：一是只要辨证准确，用药就应当机立断；二是不要忘记急则治标的根本原则(药量要足)，决不能因看到患者年老或病情复杂而裹足不前；三是中病即止，过犹不及，伤人正气，而致病情变化，虚者更虚，邪气虽去，正气难复。只要注意了这三点，中医在治疗急症方面是大有作为的，特别是对那些病情复杂不宜手术的患者更显突出，尤其能显示中医治疗的特色和优势。

关键词：中医；急腹症；三仁汤；承气汤
中图法分类号：R256.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 姜建国. 中医经典选读[M]. 北京：人民卫生出版社, 2005：227 - 284.

（编辑 冷怀明）