文章编号:1000-5404(2009)04-0341-04

论著

蛋白激酶 Cα 介导人神经胶质瘤细胞株多药耐药机制的研究

陈 晋[1],程 远[1],万敬员[2] (重庆医科大学:[1]附属第二医院神经外科,重庆 400010;[2]药学院药理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨蛋白激酶 Cα(protein kinase Cα, PKCα)在人神经胶质瘤细胞株 SHG-44 发生多药耐药过程中的作用和机制。**方法** 应用阿霉素浓度递增和间歇诱导法建立 SHG-44/ADM 耐药株,采用 PKCα 激活剂 PMA 和抑制剂 Staurosporine 分别干预 SHG-44/WT 和 SHG-44/ADM 细胞株,免疫印迹法检测 PKCα 和 MDR-1 的表达量,激酶分析 PKCα 活性,荧光分光光度计检测细胞内阿霉素浓度。**结果** PKCα 激活剂 PMA 增强细胞 PKCα 活性,同时增加 MDR-1 表达和活性;PKCα 抑制剂 Staurosporine 抑制细胞 PKCα 活性,减少 MDR-1 表达和活性。**结论** PKCα 通过 MDR-1 参与神经胶质瘤细胞的多药耐药。

关键词:神经胶质瘤;蛋白激酶 Cα;多药耐药
中图法分类号:R345;R730.264;R966 **文献标识码**:A

Mechanism of protein kinase Cα mediated multidrug resistance in human glioma cell line SHG-44

CHEN Jin[1], CHENG Yuan[1], WAN Jing-yuan[2] ([1]Department of Neurosurgery, Affiliated Second Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To understand the molecular mechanism by which protein kinase Cα mediates multidrug resistance of human glioma cell line SHG-44. Methods SHG-44/ADM was constructed by stepwise concentration increasing method and intermittent administration method. SHG-44/WT and SHG-44/ADM were treated by PKCα reactivator PMA and PKCα inhibitor staurosporine, then the expressions of PKCα and MDR-1 were detected by Western blotting, the PKCα activity was assayed by kinase, and ADM accumulation was determined by fluorescence spectrometry. Results PMA increased PKCα activity and MDR-1 protein expression and activity. Staurosporine was able to block PKCα activity and decrease MDR-1 expression and activity. Conclusion Multidrug resistance in human glioma cells is mediated by PKCα *via* MDR-1 pathway.

Key words: glioma; protein kinase Cα; multidrug resistance

神经胶质瘤化疗失败的重要原因之一是多药耐药(multiple drug resistance, MDR)[1-3],而 mdr-1 基因编码的蛋白 MDR-1(P-gp170)表达与激活是介导多种耐药的主要因素[4]。尽管人们对 MDR-1 表达与激活的原因进行了大量的研究,但其确切的分子机制仍不清楚。近年来一系列的研究表明,蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)参与肿瘤的发生、发展及预后[5]。因此,本研究以人神经胶质瘤细胞株 SHG-44/WT 野生型和建立的 SHG-44/ADM 耐药型为模型,观察 PKCα 与 MDR-1 的相互关系,进一步探讨 PKCα 对神经胶质瘤细胞耐药的影响。

作者简介:陈 晋,男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事神经胶质瘤化疗方面的研究。电话:(023)63693539, E-mail: dazushike@163.com

收稿日期:2008-05-26;修回日期:2008-07-21

1 材料与方法

1.1 材料

SHG-44 人神经胶质瘤细胞系(苏州大学医学院),阿霉素(深圳万乐药业有限公司),CCK8 试剂盒(江苏碧云天公司),PKC Assay 试剂盒(USA, upstate),Staurosporine(UK, ALEXIS),MDR-1 抗体(CHEMICON)。

1.2 细胞培养和实验分组

SHG-44 神经胶质瘤细胞培养于 RPMI1640 培养液中。在 37 ℃,5% CO_2 条件下培养,0.1% 胰蛋白酶消化传代。实验分成 6 组:①SHG-44/WT 细胞组;②Staurosporine 干预 SHG-44/WT 细胞组:用 10 μmol/L 浓度的 PKC 抑制剂 Staurosporine 处理细胞;③PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate 佛波酯)干预 SHG-44/WT 细胞组:用 100 ng/ml 浓度的 PKC 激活剂 PMA 处理细胞;④SHG-44/ADM 细胞组;⑤Staurosporine 干预 SHG-44/ADM 细胞组:用 10 μmol/L 浓度的 PKC 抑制剂 Staurosporine 处理细胞;⑥PMA 干预 SHG-44/ADM 细胞组:用 100 ng/ml 浓度

的 PKC 激活剂 PMA 处理细胞。

1.3 耐药细胞系 SHG-44/ADM 的建立

采用逐步递增阿霉素(ADM)浓度间歇作用的方法诱导,从低浓度(0.01 μg/ml)开始,作用 48 h 后弃去含药培养液,加入新鲜培养液,继续培养,待其恢复正常生长,消化传代后复用 0.1 μg/ml ADM 处理 48 h,如此反复换液、传代,逐步提高 ADM 浓度间歇诱导,得到 1 株能耐受 1 μg/ml ADM 的细胞系,命名为 SHG-44/ADM,并将其维持培养在含 0.1 μg/ml ADM 的完全培养液中,实验前 1 周更换不含 ADM 的完全培养基。

1.4 WST-8 检测肿瘤细胞活力

考虑到阿霉素溶液本身呈粉红色,可能影响 MTT 的检测,本实验选用更为敏感的 CCK-8 试剂盒,按 CCK-8 试剂盒说明操作,采用 WST-8 法检测不同浓度阿霉素对上述 6 组神经胶质瘤细胞的细胞毒作用。酶标分析仪测波长 450 nm 处每孔的光密度值[$D(450)$]并计算抑制率。抑制率 = [1 − $D(450)_{实验孔}$/$D(450)_{对照孔}$] × 100%。以药物浓度为横轴,抑制率为纵轴绘制浓度效应曲线,确定半数抑制浓度(IC_{50}),计算耐药指数(RI):耐药细胞 IC_{50}/亲本细胞 IC_{50}。

1.5 锥虫蓝拒染试验

不同方式处理的神经胶质瘤细胞传 6 孔板,加 10 μg/ml 阿霉素处理 24 h,胰酶消化后取细胞悬液滴加 0.4% 的锥虫蓝染液染色 5 min。在显微镜下随机取视野计数,数取染为蓝色(Td)及未染蓝色(Tl)的细胞数量,计算出活细胞百分率 P1 = Tl/(Td + Tl) × 100%,取 3 次均值。

1.6 免疫印迹法检测 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达量

各分组处理 48 h 后的神经胶质瘤细胞进行免疫印迹法分析细胞内 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达量,6 孔板培养细胞用蛋白裂解液裂解、超声破碎,取上清液,BCA 法测量样品中总蛋白浓度。煮沸变性后以 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜后,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(PKCα 和 MDR-1 的稀释度分别为 1∶1 000 和 1∶800)孵育过夜。TBST(TBS 中加入 0.05% 的 Tween-20)洗膜后,加入 1∶8 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜,加入化学发光显色试剂反应 5 min,X 线胶片曝光后,显影、定影。光密度分析用 KODAK MI 软件。

1.7 激酶分析 PKCα 活性

取 20 μl 样品加入 30 μl 的反应管中(含 30 mmol/L 2-ME,5 mmol/L 醋酸镁,0.04% 鱼精蛋白,20 mmol/L Tris · HCl pH 7.5,18.5 GBq-^{32}P-ATP),30 ℃ 恒温水浴 7 min,取 25 μl 至 P81 强阳离子交换滤纸上,以 75 mmol/L 磷酸缓冲液冲洗终止反应,洗涤 2 次,每次 2 min,以除去非结合的核素。烘干后转入装有 10 ml 蒸馏水的液闪瓶中,液闪仪测定放射性计数。每分钟 PKC 比活性(CPM/μg):(所测放射性计数为一本底放射性计数) × ATP 浓度/总放射性计数 × 反应时间 × 蛋白质含量。

1.8 荧光分光光度计分析不同方式处理的神经胶质瘤细胞内阿霉素的浓度

用阿霉素处理上述各组细胞 1 h,使细胞充分吸收阿霉素至胞内,然后弃掉含阿霉素的培养基,加无阿霉素的培养基使胞内阿霉素外漏 2 h,最终以细胞内剩余阿霉素浓度来衡量 MDR-1 泵出药物的能力(即 MDR-1 活性),用荧光分光光度(激发波长 478 nm,发射波长 594 nm)检测细胞裂解液中荧光强度表示 ADM 浓度,BCA 法测细胞裂解液中蛋白浓度,以蛋白浓度标准化。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 阿霉素对不同方式处理的神经胶质瘤细胞毒性作用

阿霉素对不同方式处理的神经胶质瘤细胞毒性作用结果见表 1。SHG-44/ADM 比 SHG-44/WT 的耐药指数为 10.7,可以认为 SHG-44/ADM 耐药株建立成功,采用 PKCα 激活剂 PMA 后其 IC_{50} 和 RI 明显增加,而用 PKCα 抑制剂 Staurosporine 后 IC_{50} 和 RI 降低。进一步用锥虫蓝拒染分析活细胞的百分率,其结果与 WST-8 基本一致。

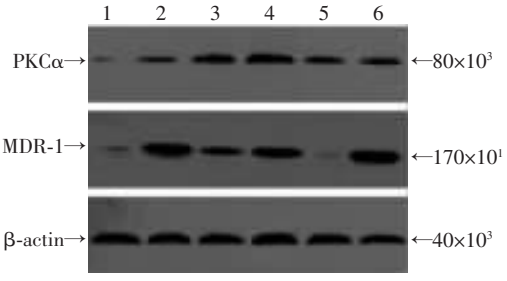
表 1 阿霉素对不同方式处理神经胶质瘤细胞毒性作用 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IC_{50}(μg/ml)	RI	存活率(%)
SHG-44/WT 组	1.67 ± 0.05		24.6 ± 11.3
SHG-44/WT + STAUR 组	0.95 ± 0.03[a]	0.57	19.8 ± 10.9[a]
SHG-44/WT + PMA 组	21.60 ± 0.56[b]	12.9	74.3 ± 10.7[b]
SHG-44/ADM 组	17.80 ± 0.52[b]	10.7	62.8 ± 12.5[b]
SHG-44/ADM + STAUR 组	9.86 ± 0.16[c]	5.9	41.7 ± 6.9[c]
SHG-44/ADM + PMA 组	66.20 ± 0.67[c]	39.6	79.3 ± 8.6[c]

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 SHG-44/WT 组比较; c: $P < 0.01$, 与 SHG-44/ADM 组比较

2.2 不同方式处理的神经胶质瘤细胞 PKCα 和 MDR-1的表达结果

免疫印迹分析 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达量见图 1。PKCα 和 MDR-1 在 SHG-44/ADM 耐药株比 SHG-44/WT 野生株表达明显增加。进一步在 SHG-44/WT 细胞中加入 PKCα 激活剂 PMA 后其 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达量均明显增加,而加入 PKCα 抑制剂 Staurosporine 后,PKCα 表达量增加,MDR-1 表达量减少;在 SHG-44/ADM 细胞中加入 PKCα 激活剂 PMA 后其 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达量均明显增加,而加入 PKCα 抑制剂 Staurosporine 后,PKCα 表达量增加,MDR-1 表达量减少。



1: SHG-44/WT 组; 2: SHG-44/ADM 组; 3: SHG-44/ADM + STAUR 组; 4: SHG-44/WT + PMA 组; 5: SHG-44/WT + STAUR 组; 6: SHG-44/ADM + PMA 组

图 1 免疫印迹法检测 PKCα 和 MDR-1 蛋白表达结果

2.3 激酶分析 PKC 活性结果

SHG-44/WT 细胞 PKC 活性为(176 000 ± 8 900) CPM/μg,

SHG-44/ADM 细胞和 PMA 处理的 SHG-44/WT 细胞的 PKCα 活性明显增高,分别为(487 000 ± 19 800) CPM/μg 和(563 000 ± 23 100) CPM/μg,与 SHG-44/WT 细胞相比差异有统计学意义($P < 0.01$);而用 PKC 抑制剂 Staurosporine 干预后其 PKCα 活性明显降低($P < 0.05$),为(91 000 ± 6 200) CPM/μg。与 SHG-44/ADM 细胞相比,用 PKC 抑制剂 Staurosporine 干预后其 PKCα 活性明显降低($P < 0.01$),为(198 000 ± 9 100) CPM/μg;而 PMA 处理的 SHG-44/ADM 细胞的 PKCα 活性明显增高,为(548 000 ± 29 100) CPM/μg,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4　荧光分光光度计检测细胞内阿霉素浓度结果

SHG-44/WT 细胞和 SHG-44/ADM 细胞内阿霉素浓度分别为(1.25 ± 0.29) CPM/μg 和 (0.39 ± 0.11) CPM/μg,SHG-44/ADM 细胞内阿霉素浓度明显降低($P < 0.01$);在 SHG-44/WT 细胞和 SHG-44/ADM 细胞中分别加入 PKCα 激活剂 PMA 后,细胞内阿霉素浓度均降低,分别为(0.52 ± 0.14) CPM/μg($P < 0.01$)和(0.27 ± 0.12) CPM/μg($P < 0.05$);而加入 PKCα 抑制剂 Staurosporine 后细胞内阿霉素浓度均增加,分别为(1.48 ± 0.29) CPM/μg($P < 0.05$)和(0.94 ± 0.16) CPM/μg($P < 0.05$)。

3　讨论

蛋白激酶 C(PKC)是 1977 年在鼠脑的胞质成分中发现的一种依赖磷脂和钙的蛋白激酶,由多种具有不同生物学特性的同工酶组成[6]。PKC 由 2 个不同的功能部位组成,即与磷脂、甘油二酯和佛波酯疏水性结合的疏水性调节部位,以及含有 ATP 的底物蛋白结合区域,后者是亲水性催化部位,调节部位可以通过关闭催化中心来灭活 PKC。Ca^{2+}、磷脂和佛波酯与调节部位结合导致构象改变,使 PKC 激活[7]。PKC 的活化与正常细胞和异常细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物学效应有关,同时也在肿瘤发生、发展及对抗瘤因子的反应方面也扮演着重要角色[8]。其中,PKCα 与肿瘤多药耐药的关系最为密切[9],因此,实验中采用了 PKCα 为研究对象。考虑到钙拮抗剂、钙调素抑制剂逆转肿瘤细胞多药耐药性的事实,推测肿瘤的耐药性可能涉及 PKC 及其受体,PKC 参与蛋白质的磷酸化过程,而 p-gp 是一种磷酸化蛋白,MDR 细胞中 PKC 活性增高,说明两者存在一定的联系。另外,有资料表明,PKC 介导的多药耐药可能与 MDR-1 基因的转录激活有关,而与 p-gp 的磷酸化无关[10]。方胜等[11]报道用免疫组化方法证实了 63 例脑胶质瘤组织中有 39.68% p-gp 阳性表达,而对照 5 例正常脑组织中无 1 例 p-gp 的阳性表达。他们还发现化疗与未化疗肿瘤 p-gp 表达存在显著性差异,p-gp 的表达率随病理级别的升高而升高。Palmantier 等[12]在研究乳腺癌耐药细胞系 MCF-7 时发现,PKCα 能通过使 MDR-1 基因的启动子磷酸化而增加其转录,且这种活动能够被 PKC 的激活剂佛波酯(TPA)所诱导,而被 PKC 的阻滞剂 GF109203X 所消弱。并且,把转染的反义 PKCα 注入到细胞中,能够逆转 MDR 表型。本研究基于上述特点,探讨了 PKC 与脑胶质瘤耐药的机制,结果提示通过抑制 PKCα 的表达可减弱肿瘤的抗药性,为临床上解决脑胶质瘤耐药性提供了一种新方法。尽管 PKC 是通过转录水平调控还是转录后磷酸化调控 MDR-1 的报道不一,但是本实验提示 MDR-1 的高表达可以增加其泵出药物的能力,从而达到耐药的结果,因此,综合本实验可以认为:PKC 是通过 MDR-1 参与多药耐药是毋庸置疑的。

在本研究中,我们以人神经胶质瘤细胞株 SHG-44 为研究对象,探讨 PKCα 是否参与神经胶质瘤细胞的多药耐药。结果表明,通过逐步递增阿霉素(ADM)浓度间歇作用诱导的 SHG-44/ADM 耐药株(耐药指数为 10.7)PKCα 蛋白、PKCα 活性及 MDR-1 表达和活性明显增加(相对于其亲本 SHG-44/WT)。为了进一步明确 PKCα 在多药耐药中的作用,分别在 SHG-44/WT 和 SHG/ADM 细胞中加入 PKCα 激活剂 PMA 后,其对阿霉素的半数抑制率、耐药指数和细胞存活率均增高,PKCα 蛋白表达和活性均明显增加,同时研究表明,MDR-1 表达和活性均增加(分别与 SHG-44/WT 和 SHG-44/ADM 组细胞相比),细胞内阿霉素浓度降低。用 PKCα 抑制剂 Staurosporine 分别干预 SHG-44/WT 和 SHG-44/ADM 后,其对阿霉素的半数抑制率、耐药指数和细胞存活率均降低,PKCα 活性明显降低,但 PKCα 蛋白表达增加,这种蛋白增加可能是 Staurosporine 使 PKCα 活性降低后,细胞的一种反馈性促进 PKCα 蛋白表达所致,这一现象在其它实验中已得到证实,同时 PKC 的抑制剂 Staurosporine 干预 SHG-44/WT 和 SHG-44/ADM 细胞后细胞内阿霉素浓度增高,MDR-1 的表达和活性降低。这一研究结果表明,PKCα 的高表达,使 PKCα 活性增强,进而促进 MDR-1 的表达增高,其针对抗肿瘤药物的泵出作用增强,从而产生多药耐药。至于 PKCα 是通过何种方式促进 MDR-1 的表达,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 杨宇飞, 肖　红, 赵　亮, 等. SiRNA 多位点逆转人神经胶质瘤细胞的多药耐药性[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(4): 307 - 310.

[2] 许洪升, 陈忠平. 脑胶质瘤原代细胞药敏与 06-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶表达的相关性研究[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1): 119.

[3] 赵　亮, 肖　红, 冯　芳. 神经胶质瘤基因治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(7): 492 - 494.

[4] 王成伟, 马道新, 潘 顺, 等. C6胶质瘤细胞多药耐药基因启动子靶向的双自杀基因表达载体的构建及鉴定[J]. 中华神经外科杂志, 2005, 21(11): 691-694.
[5] Zielinska M, Zablocka B, Dybel A, *et al*. The role of protein kinase C and cyclic AMP in the ammonia-induced shift of the taurine uptake/efflux balance towards efflux in C6 cells[J]. Neurochem Res, 2005, 30(3): 349-354.
[6] Blobe G C, Stribling S, Obeid L M, *et al*. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function[J]. Cancer Surv, 1996, 27: 213-248.
[7] Ron D, Kazanietz M G. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(13): 1658-1676.
[8] Basu A, Sivaprasad U. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision[J]. Cell Signal, 2007, 19(8): 1633-1642.
[9] Righetti S C, Perego P, Carenini N, *et al*, Molecular alterations of cells resistant to platinum drugs: role of PKCalpha[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1763(1): 93-100.
[10] Couldwell W T, Antel J P, Yong V W. Protein kinase C activity correlates with the growth rate of malignant gliomas: Part Ⅱ. Effects of glioma mitogens and modulators of protein kinase C[J]. Neurosurgery, 1992, 31(4): 717-724.
[11] 方 胜, 袁先厚, 裴永恩, 等. p-gP、bcl-2和bax蛋白在人脑胶质瘤中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(1): 72.
[12] Palmantier R, George M D, Akiyama S K, *et al*. Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type Ⅳ collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu[J]. Cancer Res, 2001, 61(6): 2445-2452.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)04-0344-01

1例废墟中掩埋170余小时患者急救的护理体会

黄 敏,刘玉馥,褚玲玲 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

在5·12汶川大地震中,我院深入到震中汶川县映秀镇参加抗震救灾救治工作,现将我院在一线救治1例在废墟中掩埋178 h 20 min患者的护理体会报告如下。

1 病例资料

患者,男性,32岁,地震时被垮塌的6层办公大楼埋压于一楼与二楼之间的楼梯间,呈头低脚高位,于被埋后178 h 20 min被救出,现场查体:血压0 mmHg,脉搏摸不清,神智恍惚,能正确回答部分问题,有幻觉,头部及全身多处皮肤擦伤伴感染,左前臂缺血性坏死,经现场扩充血容量治疗,10 min后血压恢复至100/60 mmHg,左前臂坏死端用止血带扎住并用夹板固定后,送临时野战医疗所,经吸氧、抗感染、继续补充血容量、保护胃粘膜、导尿等措施后患者血压平稳,在被救出10 h,患者小便达900 ml,未出现胃出血。由于临时野战医疗所条件限制,无法进行进一步化验、检查及治疗,于5月20日11:30乘直升飞机及救护车转送至后方医院,转送过程3 h,转送途中曾出现血压不稳,给予多巴胺40 mg、间羟胺20 mg加入生理盐水250 ml中缓慢静滴,维持血压。于5月20日14:30安全送达我院。

2 护理

2.1 现场急救的护理

确保现场抢救环境的相对独立,针对抢救现场媒体众多,人员杂乱不利于救治等情况,由战士围成隔离带,非医护人员及正在进行挖掘工作的消防战士禁止入内,在现场形成临时抢救点。迅速建立静脉补液通道,实施紧急救护。患者被救出时,周围静脉严重塌陷,我们立即分颈静脉、肘静脉、股静脉3组穿刺,静脉通道建立成功后分别输入生理盐水,5%的糖盐水,人血白蛋白,10 min内补入液体约1 000 ml。现场初步检伤后迅速结扎坏死肢体,转运过程中,减少结扎肢体活动,用夹板固定肢体,并让肢体暴露在流通的空气中。

2.2 临时野战医疗所里的监护与救治

2.2.1 密切观察病情变化、及时记录 监测血压、脉搏1次/5 min;给予导尿,观察尿的颜色、性质、量的多少;测体温1次/30 min,出现发热后(T 38.5 ℃)给予物理降温;观察结扎近心端的肢体肿胀情况及皮肤颜色及温度。患者血压稳定、尿量大于30 ml/h后,控制输液滴速至60~80滴/min,合理安排输液顺序,尽早输入抗生素,予头孢噻肟钠3.0 g加入生理盐水100 ml中静滴,1次/8 h。

2.2.2 基础护理 患者在黑暗环境时间长达170余小时,被救出后始终用纱布遮盖眼部,以防形成视盲;患者神智亢奋,有幻觉,由3名护士守护防止坠床;患者口腔异味明显,给予生理盐水漱口1次/2 h;患者痰多,为褐色粘液痰,考虑为地震时大量灰尘吸入所致,给予翻身拍背,1次/30 min;患者全身多处擦伤,给予及时清创、消毒;患者全身布满灰尘,给予擦洗,并对静脉穿刺部位进行反复消毒,减少医源性感染的发生。

2.2.3 心理护理 患者本身文化素质较高,有很强的求生欲望,虽然野战医疗所条件艰苦,但对患者的生命安全有基本的保障,对患者进行心理疏导,坚定患者必胜的信心。

(下转348页)

作者简介:黄 敏,女,重庆市人,主管护师,E-mail:hm19791206@sina.com
收稿日期:2008-10-12;修回日期:2008-11-27