文章编号:1000-5404(2009)11-0997-05

论著

RCS大鼠自然病程中视网膜边缘生发区细胞增殖及Shh/Ptc信号途径改变的观察

蹇 骞[1],徐海伟[2],谢汉平[1],阴正勤[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军眼科中心,[2]基础医学部生理学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察遗传性视网膜色素变性RCS大鼠病程发展中视网膜边缘生发区Shh/Ptc信号途径改变及其与该区细胞增殖能力变化的关系。**方法** RCS大鼠按出生后病程变化分为15、30、60、90 d 4组(免疫组化每组4只,PCR每组3只),以同龄含色素的正常大鼠(Long-Evan's大鼠)作为正常对照。视网膜组织切片DAPI荧光染色观察外核层(outer nuclear layer, ONL)厚度的变化;视网膜细胞增殖标记Ki67免疫荧光染色观察视网膜边缘生发区细胞增殖能力的变化;荧光定量PCR检测视网膜边缘生发区Shh/Ptc信号途径中关键分子Shh、Ptc1、Smo和Gli1 mRNA表达水平。**结果** ①RCS大鼠从第15天开始,随着年龄的增加视网膜ONL逐渐变薄,第90天ONL几乎消失。②正常对照组大鼠视网膜边缘生发区Ki67阳性细胞较少,与同龄正常对照组大鼠相比,出生30、60 d组大鼠Ki67阳性细胞数均显著增多($P<0.05$);大鼠各年龄组间比较,60 d组Ki67阳性细胞数明显增多($P<0.01$)。③ 60 d组大鼠视网膜边缘生发区Shh、Ptc1、Smo和Gli1 mRNA表达水平明显上调。**结论** 出生后60 d RCS大鼠视网膜边缘生发区Shh/Ptc信号途径的激活,可能刺激了该部位细胞短期的增殖。

关键词: 视网膜色素变性;视网膜干细胞;细胞增殖;Shh/Ptc信号途径;荧光定量PCR
中图法分类号: R322.91; R329.2; R774.13 **文献标识码:** A

Shh/Ptc pathway and retinal stem cells in proliferating marginal region of RCS rats during development of retinitis pigmentosa

JIAN Qian[1], XU Hai-wei[2], XIE Han-ping[1], YIN Zheng-qin[1] ([1]Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the relationship of activation of retinal cells in the proliferating marginal region of Royal College of Surgeon's rats (RCS rats, an animal model for inherited retinal degeneration), and the expressional changes of sonic hedgehog-patched (Shh/Ptc) signaling during development of retinitis pigmentosa. **Methods** Totally 28 RCS rats were divided into 4 groups randomly, that is, postnatal day (PND) 15, 30, 60 and 90 group according to the severity of degeneration (in each group, 4 rats for immunofluorescence staining and the left 3 for PCR analysis). Age-matched Long-Evan's rats without retinal degeneration served as controls. The thickness of outer nuclear layer (ONL) was detected by using DAPI immunofluorescence staining. Ki67, a proliferating marker was detected using immunofluorescence staining, and positive cells were counted per counting-field in the proliferating marginal region of the retinal. mRNA expressions of Shh, Ptc1, Smo and Gli1 in Shh/Ptc signaling pathway were detected by fluorescent quantitation PCR. **Results** Compared with age-matched Long-Evan's rats, the thickness of ONL of RCS rats had been decreased with aging since PND 15, and almost disappeared at PND 90 RCS rats. There were more Ki67 positive cells at PND 30 and PND 60 RCS rats than in age-matched Long-Evan's rats ($P<0.05$); compared with PND 15, PND 30 and PND 90 RCS rats, the positive cells at PND 60 RCS rats were increased markedly ($P<0.01$). mRNA levels of Shh, Ptc1, Smo and Gli1 in Shh/Ptc signaling pathway were upregulated at PND 60 RCS rats compared with PND 15, PND 30, PND 90 RCS rats and age-matched Long-Evan's rats. **Conclusion** Retinal cells are activated to proliferate at the proliferating marginal region within a short time in the retinal of RCS rats at PND 60, which might be regulated by Shh/Ptc pathway.

Key words: retinitis pigmentosa; retinal stem cells; cell proliferation; Shh/Ptc pathway; fluorescent quantitation PCR

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2007CB512203)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2007CB512203)
作者简介: 蹇 骞,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事视网膜变性机制方面的研究。电话:(023)68754401,E-mail:lfjianqian@163.com
通信作者: 阴正勤,电话:(023)68754401,E-mail: qinzyin@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-01-24;**修回日期:** 2009-02-26

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa,RP)是遗传性视觉损害和盲目的最常见原因之一,表现为进行性感光细胞及色素上皮功能丧失,对该病的发病机制目前尚未认识清楚。视网膜缘和睫状体平坦部被认为是视网膜边缘生发区,是终生具有视网膜干细胞(retinal stem cells, RSCs)的部位[1]。在急性损伤的情况下,低等脊椎动物 RSCs 能增殖并分化为新生神经元,替代损伤的细胞[2]。近年来研究发现,多条信号途径参与了成体干细胞增殖分化的调控[3],其中 Shh/Ptc(sonic hedgehog-patched)通路在神经祖细胞的增殖和分化、出生前后视网膜的发育过程中都起了重要的作用。在体和离体实验均证明,视网膜和睫状体上皮干细胞/祖细胞具有 Shh/Ptc 通路关键分子 Ptc1、Gli1 和 Smo 的表达,证实 Shh/Ptc 信号途径参与了眼神经干细胞的调控[4]。

皇家外科学院大鼠(royal college of surgeon's rat, RCS rat)是一种研究遗传性视网膜色素变性、遗传性年龄相关性黄斑变性疾病的经典模型,其发病机制和转归与人类相似[5,6]。RP 病程作为一种慢性损伤刺激,由于其微环境的改变,可能会通过 Shh/Ptc 信号途径对大鼠视网膜边缘生发区干细胞的增殖产生影响,这种变化可能参与了视网膜变性过程并最终影响了视网膜功能的退行性改变的发生和发展。我们采用细胞增殖标记 Ki67 免疫组化,以及荧光定量 PCR 的方法,对 RCS 大鼠视网膜生发区细胞的增殖和 Shh/Ptc 信号途径的激活做一初步观察。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

RCS 大鼠(Beckman Vision Center, UCSF School of Medicine, San Francisco, CA, USA 赠送)28 只, 20~300 g,雌雄不限,按出生后病程变化分为 15、30、60、90 d 4 组(实验组),免疫组化每组 4 只,荧光定量 PCR 每组 3 只。采用同龄含色素的正常大鼠(Long-Evan's 大鼠)作为正常对照。

1.2 实验材料与试剂

Anti-Ki67(小鼠来源,Santa Cruz 公司),山羊抗小鼠 IgG/FITC(博士德),DAPI 荧光染料(Sigma 公司),山羊封闭血清(中杉金桥),Rever Tra Ace-a-逆转录试剂盒(TOYOBO 公司),PCR System 9700、PCR System 7500(Applied Biosy Stems),Tris 碱(三羟甲基氨基甲烷,北京鼎国),*Taq* PCR Master Mix、DL 2000 购自北京天根公司。

1.3 实验步骤

1.3.1 视网膜外核层(outer nuclear layer,ONL)厚度测量 常规麻醉动物,取出眼球,固定后,沿眼杯冠状面行组织冰冻切片(12 μm),将视网膜组织切片行 DAPI 荧光染色并照相。每只大鼠随机选取 5 张切片,采用 SPOT 图像分析软件测量 ONL 厚度,每张切片测 5 处取均值。

1.3.2 免疫荧光组织化学检测 视网膜冰冻切片行 Ki67 免疫荧光组织化学染色并照相,计数视网膜边缘生发区,阳性细胞取均值。计数区定义为视网膜缘 100 μm 和睫状体平坦部 50 μm 范围。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.3 荧光定量 PCR ①常规麻醉动物,取出大鼠眼球,在显微镜下完整剥离视网膜和睫状体,分离出视网膜缘和睫状体平坦部;②加 1 ml RNAout,冰上裂解后,提取总 RNA,并测定浓度;③经 42 ℃ 10 min,30 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,逆转录为 cDNA;④从 GenBank (http://www.ncbi.nih.gov/entrez/nucleotide.html) 调取大鼠 Sonic Hedgehog-patched 信号途径中关键信号分子 Shh、Ptc1、Smo 和 Gli1 完整 cDNA 序列,设计出 PCR 引物(表 1),送上海瑞捷公司合成,PAGE 纯化;⑤荧光定量 PCR 反应体系:cDNA 2 μl,上游引物(10 pmol/μl) 0.3 μl,下游引物(10 pmol/μl) 0.3 μl,2 × Mix *Taq* 10 μl, ddH_2O 7.4 μl,总体积 20 μl。反应条件为:94 ℃ 30 s,然后 63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环。反应结束后,根据 PCR 获得的熔解曲线和扩增曲线分析结果的可靠性并设定阈值,输出 C_t 值。采用比较 C_t 值定量方法进行基因表达的比值计算。具体的公式为:$2^{-\Delta\Delta C_t}$,其中 $\Delta\Delta C_t = (C_t\text{ 目的基因} - C_t\text{ 管家基因})_{实验组} - (C_t\text{ 目的基因} - C_t\text{ 管家基因})_{对照组}$。目的基因包括 Shh、Ptc1、Smo 和 Gli1,管家基因指 GAPDH。

表 1 PCR 引物序列

cDNA	引物序列	产物大小
Shh	上游 5′-CCCAATTACAACCCCGACATCAT-3′	162 bp
	下游 5′-GTCCTCATCCCAGCCCTCAGTC-3′	
Ptc1	上游 5′-CCGGGACCTGCTTTCTCAATT-3′	162 bp
	下游 5′-CCCAGCAAGCCCAGGAAAAG-3′	
Smo	上游 5′-CCCCTTCGTCCTCACTGTGG-3′	229 bp
	下游 5′-TCTTGCTGGCTGCCTTCTCAC-3′	
Gli1	上游 5′-ACGCCTCGAAAACCTGAAGACA-3′	164 bp
	下游 5′-CCGGGGAGTTTGCACACATAT-3′	
GAPDH	上游 5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′	159 bp
	下游 5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′	

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行完全随机设计 t 检验、方差分析及秩和检验。

2 结果

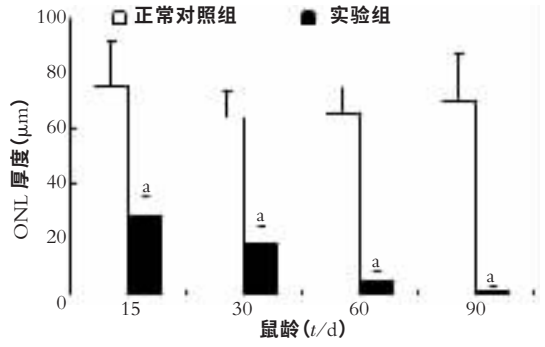
2.1 RCS 大鼠视网膜 ONL 厚度变化

正常对照组大鼠视网膜组织结构完整,从内到外依次为神经节细胞层(ganglion cell layer,GCL)、内核层(inner nuclear layer,INL)和 ONL,15、30、60 d 和 90 d 4 组之间 ONL 厚度没有统计学差异($P>0.05$);与同龄正常对照组大鼠比较,实验组大鼠 15 d ONL 开始变薄($P<0.01$),但结构完好,细胞排列紧密;30 d 和 60 d 组 ONL 明显变薄($P<0.01$),且结构紊乱,但 INL 和 GCL 形态基本正常;90 d 组 ONL 几乎完全消失($P<0.01$, 图 1)。

2.2 RCS 大鼠视网膜边缘生发区细胞增殖能力的变化

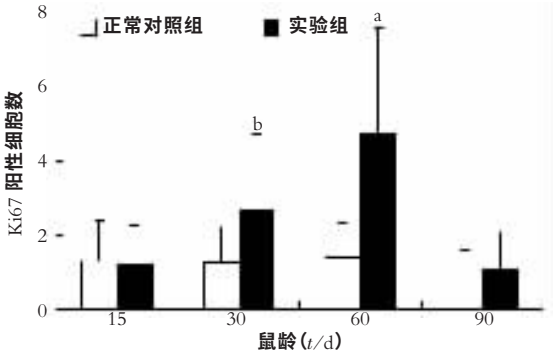
实验组大鼠各组视网膜边缘生发区均可见 Ki67 阳性细胞,细胞核着色,形态为长椭圆形或卵圆形,分裂中的细胞核可

不规则。15 d 和 90 d 组阳性细胞较少,30 d 组开始增多,60 d 组增多明显,显著高于 15、30 d 和 90 d 组($P<0.01$)。作为对照组的大鼠阳性细胞较少,与同龄实验组大鼠比较,15 d 和 90 d 组差异无统计学意义($P>0.05$),30、60 d 组差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,图 2、3)。



a:$P<0.01$,与同龄正常对照组比较

图 1　不同年龄组大鼠视网膜 ONL 厚度的变化



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与同龄正常对照组比较

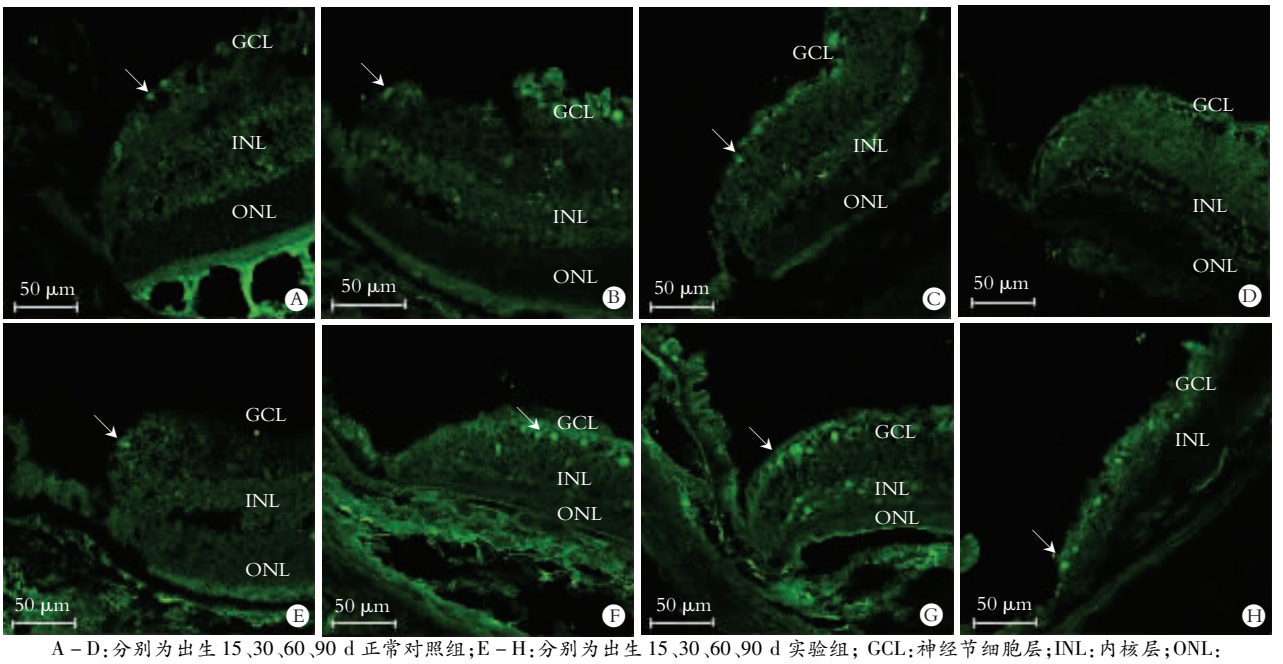
图 3　不同年龄组大鼠视网膜边缘生发区 Ki67 阳性细胞数量的变化

2.3　RCS 大鼠视网膜边缘生发区 Shh/Ptc 信号通路的改变

Shh/Ptc 信号途径中 4 个关键分子 Shh、Ptc1、Smo 和 Gli1 mRNA 在实验组大鼠和正常对照组大鼠视网膜边缘生发区均有表达。实验组大鼠各年龄组间比较,在 60 d 时,出现了不同程度的表达上调,且与同龄对照组相比,表达水平也有不同程度的增高,Gli1 表达有显著性差异($P<0.05$),Shh 和 Smo 表达有非常显著性差异($P<0.01$,图 4)。

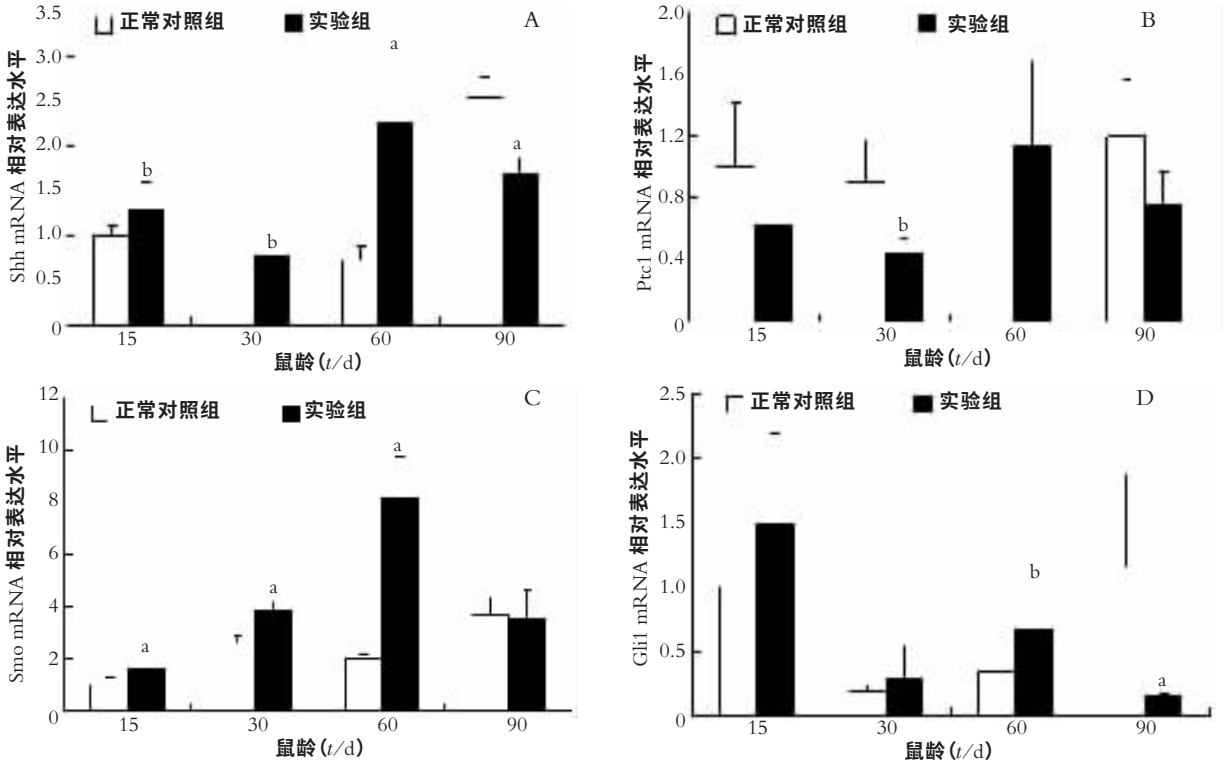
3　讨论

视网膜的发育遵循从中心到周边的原则。即中心部位的视网膜最早开始形成,而周边部位的发育相对滞后,其细胞类型比较原始。因此出生后,视网膜干细胞可残留于视网膜缘及邻近的睫状体平坦部上皮,该部位被认为是视网膜的边缘生发区[1,7]。随着脊椎动物从低等到高等的进化,视网膜干细胞的分布从中心向周边部位减退,增殖能力逐渐降低,神经发生逐渐减少。鱼类和两栖类动物视网膜干细胞主要位于视网膜缘,又称为睫状缘区(ciliary margin zone,CMZ),它能产生所有类型的视网膜细胞,其视网膜终生都在生长和延伸。而鸟类、哺乳类动物在胚胎期就完成了神经发生、分化、功能成熟,神经元间连接形成,鸟类仅有少量干细胞位于视网膜缘和睫状体平坦部,哺乳类的干细胞则主要位于睫状体平坦部,并且成年后,仅鸟类有少量的新神经元增加到功能视网膜,哺乳动物则没有新的神经元增加。随着年龄增加,视网膜干细胞增殖和神经发生的能力都降低[1,8]。



A－D:分别为出生 15、30、60、90 d 正常对照组;E－H:分别为出生 15、30、60、90 d 实验组;GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层;箭头所示为阳性细胞

图 2　免疫荧光组织化学检测不同年龄组大鼠视网膜边缘生发区 Ki67 阳性细胞的变化



A:Shh mRNA;B:Ptc1 mRNA;C:Smo mRNA;D:Gli1 mRNA a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与同龄正常对照组比较

图4 不同年龄组大鼠荧光定量 PCR 检测视网膜边缘生发区 Shh/Ptc 信号途径中关键分子的表达水平

国内外很多学者对哺乳类动物视网膜干细胞进行了研究。之前普遍认为,哺乳类动物在胚胎期,视网膜发育已经完成,出生后视网膜不再有神经发生[9]。后来陆续有学者发现,在成年(3~4周)大鼠和小鼠视网膜睫状体上皮存在少量具有未分化干细胞特性的色素细胞。在体研究也证实,在1个月左右小鼠视网膜睫状体上皮观察到了 BrdU 阳性细胞的存在[10-13]。本实验也证实仅幼年野生型 Long-Evan's 大鼠视网膜边缘生发区有少量增殖干细胞,成年后几乎没有,提示野生型大鼠出生后视网膜干细胞的增殖能力非常有限。在低等脊椎动物已经证实,在受到损伤刺激时,视网膜边缘生发区干细胞能被激活、增殖并产生新的神经元,修复损失区域[14]。我们的研究结果表明,在视网膜色素变性中后期,视网膜边缘生发区出现大量增殖细胞,到了变性晚期,增殖细胞数量明显减少。虽然有报道视网膜胶质细胞具有一定的增殖潜能[15],但在视网膜缘以及睫状体平坦部,胶质细胞分布较少,这些增殖细胞很可能是激活的干细胞。我们的结果提示视网膜色素变性作为一种慢性损伤刺激,可能激活视网膜边缘生发区的干细胞,而出现短期的活化并增殖。

Hedgehog(Hh)是一种分泌糖蛋白,离体条件下,是视网膜祖细胞的促有丝分裂因子[16]。其受体复合物是由12次跨膜受体 Patched(Ptc)和7次跨膜蛋白 Smoothen(Smo)组成。在没有 Shh 的情况下,Smo 的活性受到 Ptc 的抑制,一旦 Shh 与 Ptc 结合,Smo 抑制被解除,即可经转录因子 Ci/Gli 家族将信号向核内传递,该转录因子与 CREB 结合蛋白(CBP)结合后,激活靶基因,包括 Ptc1、Gli1 和细胞周期蛋白(Cyclins),促进干细胞的增殖、抑制其分化。

在视网膜中,配体 Shh 主要存在于神经节细胞、无长突细胞和内核层。在胚胎期,最早形成的神经节细胞分泌 Shh,维持视网膜干细胞的增殖。Shh 浓度梯度的变化,可调控干细胞适时退出有丝分裂周期,并向特定神经元细胞类型分化[17]。该通路信号的连续传递有赖于两方面:一是神经节细胞对配体 Shh 分泌,二是靶细胞受体的表达。本实验结果表明,RCS 大鼠在出生后60 d,随着大量感光细胞的死亡,视网膜缘配体 Shh 和受体 Ptc1、Smo 的表达均明显增高,且下游分子 Gli1 亦显著上调,同时大量增殖细胞随之出现。提示视网膜变性,可能刺激了神经节细胞 Shh 的分泌和视网膜缘干细胞 Ptc1、Smo 受体的表达,Shh/Ptc 信号途径的激活,使干细胞重新加入细胞周期,开始大量增殖。但到了变性晚期,干细胞的增殖显著减少,其原因可能是神经节细胞也出现了变性和死亡,致使 Shh 的分泌减少,不足以激活大量干细胞持续增殖,也可能是大鼠视网膜边缘生发区干细胞数量和增殖能力有限,最终没能修复损伤的细胞,亦没能逆转变性进程。

我们的实验还发现,出生90 d正常对照组大鼠 Shh/Ptc 信号分子表达显著增高,但并没有观察到大量细胞的增殖。说明干细胞增殖的调控十分复杂,可能

有诸多有丝分裂因子和信号途径的参与,具体机制还需要进一步的研究。同时,大鼠视网膜干细胞增殖能力有限,怎样大量激活视网膜干细胞,并使之分化产生有功能的神经元是另一个迫切需要解决的问题。

参考文献:

[1] Fischer A J, Reh T A. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens[J]. Dev Biol, 2000, 220(2): 197-210.
[2] Moshiri A, Close J, Reh T A. Retinal stem cells and regeneration[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(8-9): 1003-1014.
[3] Ahmad I, Das A V, James J, *et al*. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(1): 53-62.
[4] Perron M, Boy S, Amato M A, *et al*. A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation[J]. Development, 2003, 130(8): 1565-1577.
[5] Chen Z S, Yin Z Q, Chen S, *et al*. Electrophysiological changes of retinal ganglion cells in Royal College of Surgeons rats during retinal degeneration[J]. Neuroreport, 2005, 16(9): 971-975.
[6] D'Cruz P M, Yasumura D, Weir J, *et al*. Mutation of the receptor tyrosine kinase Mertk in the retinal dystrophic RCS rat[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(4): 645-651.
[7] Amato M A, Arnault E, Perron M. Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(8-9): 993-1001.
[8] Fischer A J. Neural regeneration in the chick retina[J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24(2): 161-182.
[9] Kubota R, Hokoc J N, Moshiri A, *et al*. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 134(1-2): 31-41.
[10] Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 517-512.
[11] Tropepe V, Coles B L, Chiasson B J, *et al*. Retinal stem cells in the adult mammalian eye[J]. Science, 2000, 287(5460): 2032-3036.
[12] Moshiri A, Reh T A. Persistent Progenitors at the Retinal Margin of ptc +/- Mice[J]. J Neurosci, 2004, 24(1): 229-237.
[13] Xu H, Sta-Iglesia D D, Kielczewski J L, *et al*. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(4): 1674-1682.
[14] Stenkamp D L, Powers M K, Carney L H, *et al*. Evidence for two distinct mechanisms of neurogenesis and cellular pattern formation in regenerated goldfish retinas[J]. J Comp Neurol, 2001, 431(4): 363-381.
[15] Wan J, Zheng H, Chen Z L, *et al*. Preferential regeneration of photoreceptor from Muller glia after retinal degeneration in adult rat[J]. Vision Res, 2008, 48(2): 223-234.
[16] Oliver T G, Grasfeder L L, Carroll A L, *et al*. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 7331-7336.
[17] Zhang X M, Yang X J. Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog[J]. Development, 2001, 128(6): 943-957.

(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2009)11-1001-01

个案与短篇

银杏叶提取物对蛋白氧化终产物损伤大鼠血管内皮的保护作用

陈双秀[1],李先霞[1],凌伯勋[1],方叶青[2] ([1]岳阳职业技术学院药学与检验系药理教研室,湖南 岳阳 414000;[2]中南大学湘雅医院心血管内科,长沙 410078)

蛋白氧化终产物(advanced oxidation protein products, AOPP)是蛋白质被氧化修饰的产物。轻度肾功能减退患者体内AOPP水平已明显增高,透析治疗的慢性肾衰患者颈总动脉内膜厚度与血浆AOPP水平呈正相关,说明AOPP可能参与了动脉粥样硬化(AS)的形成[1]。银杏叶提取物(extract of ginkgo biloba, EGb)能降低血压、减少心衰患者的死亡率。本实验采用AOPP诱导血管内皮损伤,并观察EGb的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

雄性SD(2~3个月)大鼠40只,体质量200~250 g,由湘雅医学院动物学部提供。无内毒素牛血清白蛋白(BSA)、EGb、L-精氨酸、超氧化物歧化酶(SOD)、去氧肾上腺素、乙酰胆碱(ACh)购自Sigma公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 AOPP-BSA的制备 将BSA与次氯酸以1∶120的物质的量比等体积混合,室温放置30 min,制备出AOPP-BSA。AOPP含量测定:以氯胺-T(0~100 μmol/L)在340 nm处吸光度值为标准曲线,测定AOPP在340 nm处的吸光度值[*D*(340)]。AOPP浓度以相应氯胺-T浓度表示。

1.2.2 动脉环的制备和血管张力的检测 击昏大鼠,迅速取胸主动脉置入4 ℃ K-H液中,制备成4 mm长血管环。将血管环悬挂于不锈钢挂钩上,连接张力换能器记录张力变化。

1.3 实验设计与分组

1.3.1 EGb和AOPP-BSA对血管内皮功能的影响 分11组,每组8个血管环。①正常对照组;②BSA对照组:用3 mmol/L BSA;③~⑤AOPP-BSA组:分别用1、2、3 mmol/L AOPP-BSA孵

(下转1008页)

作者简介:陈双秀,女,湖南省岳阳市人,硕士,副教授,主要从事心血管药理方面的研究。E-mail:cshuangxiu@126.com

收稿日期:2008-07-02;修回日期:2009-03-29