论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1572-04

替米沙坦对脂多糖诱导3T3-L1脂肪细胞炎症通路的影响

赵 珏,窦京涛,臧 丽,李晓瑾,薛 冰,汪保安,马芳玲 (100853 北京,解放军总医院内分泌科)

[摘要] **目的** 研究替米沙坦对脂多糖诱导3T1-L1脂肪细胞炎症通路的影响,探讨替米沙坦的抗炎机制。**方法** 将3T3-L1脂肪细胞诱导至90%成熟,按随机数字表法分为6组:对照组、LPS组、LPS+替米沙坦(0.01、0.1、1和10 μg/ml)组($n=18$),向对照组细胞中加DMSO,LPS+替米沙坦组细胞中加入不同浓度替米沙坦,孵育2 h后,LPS组和LPS+替米沙坦组再加入脂多糖(1 μg/ml),孵育1 h,Western免疫印记法比较各组核蛋白NF-κBp65、总蛋白p-IκBα、IκBα、p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38MAPK、p38MAPK的表达水平。**结果** 脂多糖刺激后IκBα磷酸化蛋白表达增强($P<0.05$),细胞核内NF-κBp65蛋白表达增多($P<0.05$),MAPK通路相关蛋白ERK1/2磷酸化和p38MAPK磷酸化水平明显增强($P<0.05$),替米沙坦可抑制IκBα磷酸化和NF-κBp65核转位,p-IκBα蛋白表达和核蛋白NF-κBp65表达均降低,大剂量替米沙坦(10 μg/ml)作用时该作用明显($P<0.05$)。替米沙坦干预后,p-ERK1/2和p-p38MAPK蛋白表达也受到明显抑制($P<0.05$),大剂量(10 μg/ml)时作用明显($P<0.05$)。**结论** 在3T3-L1脂肪细胞中,替米沙坦可以抑制NF-κB通路中IκBα蛋白磷酸化、NF-κBp65蛋白核转位以及MAPK通路中ERK1/2蛋白和p38MAPK蛋白的磷酸化,从而发挥抗炎作用。

[关键词] 替米沙坦;受体,血管紧张素,1型;脂肪细胞;炎症

[中图法分类号] R587.1; R392.32; R972.6 [文献标志码] A

Telmisartan modulates phlogistic pathways in LPS-induced 3T3-L1 adipocytes

Zhao Jue, Dou Jingtao, Zang Li, Li Xiaojin, Xue Bing, Wang Bao'an, Ma Fangling (Department of Endocrinology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the anti-inflammatory role of angiotensin Ⅱ AT1 receptor antagonist, telmisartan, in LPS-induced 3T3-L1 adipocytes. **Methods** After differentiated 3T3-L1 adipocytes were exposed to telmisartan (0, 0.01, 0.1, 1 and 10 μg/ml) respectively for 2 h, they were treated with LPS (1 μg/ml) for another 1 h. The cells treated with DMSO served as control. The expression of NF-κBp65, IκBα, p-IκBα, p38MAPK, p-p38MAPK, ERK1/2 and p-ERK1/2 was detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, LPS significantly increased the translocation of NF-κBp65 from the cytoplasm to the nucleus and phosphorylation of IκBα, ERK1/2 and p38MAPK ($P<0.05$), but telmisartan, especially when at high dose (10 μg/ml) inhibited the above mentioned process significantly ($P<0.05$). **Conclusion** In 3T3-L1 adipocytes, telmisartan can inhibit the translocation of NF-κBp65 from cytoplasm to the nucleus and phosphorylation of IκBα, ERK1/2 and p38MAPK, which may explain the anti-inflammation effect of telmisartan.

[**Key words**] telmisartan; receptor, angiotensin, type 1; adipocytes; inflammation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671095). Corresponding author: Dou Jingtao, E-mail: jingtaodou@yahoo.com.cn

近几十年来,2型糖尿病的炎症背景备受学者关注,肥胖状态下的炎症状态与2型糖尿病等肥胖相关的代谢疾病密切关联[1-2]。临床研究发现使用血管紧张素受体拮抗剂ARB或血管紧张素转化酶抑制剂(ACE-I)药物可以抑制炎症因子的表达和炎症反应,减少氧化应激,减少2型糖尿病等代谢性疾病的发生[3]。我们在基础研究中也发现阻断AngⅡ受体可降低或抑制脂肪炎症因子的表达,抑制脂肪炎症[4]。本实验以脂多糖刺激诱导成熟3T3-L1脂肪细胞为炎症模型[5-6],观察AngⅡ受体拮抗剂-替米沙坦干预后,NF-κB通路和MAPK通路相关蛋白活化水平的变化,进一步明确替米沙坦抗炎的信号传导机制,以期为2型糖尿病的诊断及治疗提供新的思路和方法。

[基金项目] 国家自然科学基金(30671095)

[通信作者] 窦京涛,E-mail:jingtaodou@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

3T3-L1 脂肪细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院，胎牛血清、DMEM 培养液购自 HyClone 公司，Telmistan（纯度 > 99%）、脂多糖、牛胰岛素均购自 Sigma 公司，NF-κBp65 抗体、p38 抗体、p-IKBα、JNK 抗体、β-actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗系 Santa Cruz 公司产品，ERK1/2 抗体购自 ABGAB 公司，p-JNK、p-ERK1/2、p-p38 抗体均购自 Cell signaling 公司，核内参 Histon3.1 抗体购自 signalway 公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪细胞的培养及诱导分化 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，在 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养，每 3 天换 1 次液。待细胞接触抑制 2 d 后，以 10% 胎牛血清、0.5 mmol/L IBMX、0.25 μmol/L 地塞米松、10 μg/ml 胰岛素的 DMEM 培养基培养 3 d，换用 10% 胎牛血清、10 μg/ml 胰岛素的 DMEM 培养基培养 3 d，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养，每 2 天换 1 次液，8 ~ 12 d 约 90% 的细胞分化为成熟脂肪细胞，即可用于实验。

1.2.2 脂肪细胞鉴定 吸去培养液，用 PBS 冲洗 3 次，加入 10% 甲醛磷酸盐缓冲液室温下固定 1 h，吸弃固定液，加入油红 O 染色工作液染色 30 min，洗净染液，双蒸水冲洗 3 次，倒置显微镜下观察。

1.2.3 替米沙坦溶液的配制 替米沙坦溶于 100% DMSO，浓度为 1 mg/ml，用 DMEM 培养液稀释至 10 μg/ml，-20 ℃保存待用。各组 DMSO 使用终浓度应小于 0.5%，该浓度对细胞无毒性[7]。

1.2.4 细胞分组和药物干预 3T3-L1 脂肪细胞诱导至 90% 成熟，采用随机数字表法将细胞分为 6 组：对照组，LPS 组和 LPS + 替米沙坦 0.01、0.1、1 和 10 μg/ml 组（$n = 18$）。对照组细胞加入 DMSO，LPS + 替米沙坦组细胞加入替米沙坦（0.01、0.1、1 和 10 μg/ml）孵育 2 h 后，LPS 组和 LPS + 替米沙坦各浓度组再加入脂多糖（终浓度 1 μg/ml），孵育 1 h。细胞经上述处理后，提取核蛋白和总蛋白，蛋白少量分装，-80 ℃保存待用。Bradford 法测蛋白浓度。

1.2.5 Western blot 检测核蛋白 NF-κBp65、p-IκBα、p-JNK、p-ERK1/2、p-p38、p-JNK 的表达水平

1.2.5.1 核蛋白表达的检测 配制 15% SDS-PAGE 凝胶，各取 20 ~ 25 μl 等量蛋白加至凝胶孔中，4 ℃电泳，电泳结束后，切胶、转膜、室温封闭 2 h、一抗（浓度 1∶500）4 ℃孵育过夜，二抗（浓度 1∶5 000）室温避光孵育 100 min，洗膜后用 ECL 发光试剂发光显影以及压片。所得条用 Image tool 软件扫描灰度值，用核内参校正。

1.2.5.2 总蛋白和磷酸化蛋白表达的检测 配制 10% SDS-PAGE 凝胶，各取 20 ~ 25 μl 等量蛋白加至凝胶孔中，4 ℃电泳，电泳结束后，切胶、转膜、室温封闭、4 ℃一抗孵育过夜（抗体浓度 p-ERK1/2、p-p38 为 1∶800，p-IκBα 为 1∶500），二抗（浓度 1∶5 000）孵育，ECL 发光试剂发光显影以及压片。测得磷酸化条带后，用膜再生液室温摇晃洗膜 30 min，封闭、一抗（浓度 ERK1/2 为 1∶800，p38、IκBα 均为 1∶500）孵育，二抗（浓度1∶5 000）孵育，ECL 发光试剂发光显影以及压片测总蛋白。用 Image tool 软件扫描灰度值，用磷酸化蛋白与总蛋白的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析。

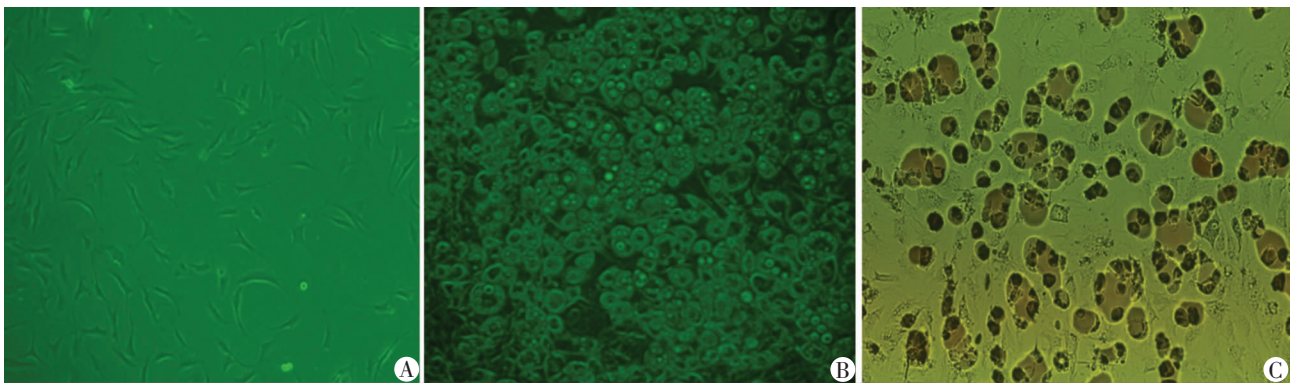
2 结果

2.1 3T3-L1 脂肪细胞的培养与鉴定

未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞是成纤维细胞，细胞质中不含脂滴（图 1A）。诱导第 8 ~ 12 天的细胞约 90% 多呈脂肪细胞表型，表现为细胞质中含多个脂滴（图 1B）。油红 O 染色后脂质部分染成红色和橘黄色，典型的成熟脂肪细胞形成“指环样”结构（图 1C）。

2.2 Western blot 结果

2.2.1 替米沙坦对脂多糖诱导 3T3-L1 脂肪细胞总蛋白 p-ERK1/2、p-p38MAPK、p-IκBa 和核蛋白 NF-κBp65 表达水平的影响 与对照组相比，LPS 组脂肪细胞中 p-p38MAPK 和 p-ERK1/2 表达明显增强（$P < 0.05$），但是未检测到 p-JNK 的表达。LPS 刺激的 p-p38MAPK 和 p-ERK1/2 表达能被替米沙坦抑制，并且均在其大剂量（10 μg/ml）时抑制作用有显著意义（$P < 0.05$）。与对照组相比，LPS 组脂肪细胞核蛋白 NF-κBp65 和总蛋白 p-IκBα 表达明显增强（$P < 0.05$），而替米沙坦可抑制上述表达，且均在大剂量（10 μg/ml）时有显著意义（$P < 0.05$），见表 1。



A：分化前（×200）；B：诱导第 8 天（×200）；C：油红 O 染色鉴定结果（×400）

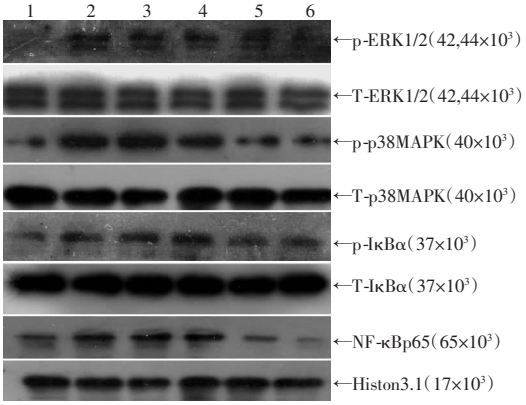
图 1 3T3-L1 脂肪细胞的培养及鉴定 （倒置显微镜）

表1 各组 p-ERK1/2、p-p38MAPK、p-IκBa 和核蛋白 NF-κBp65 的相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	p-ERK1/2	p-p38MAPK	NF-κBp65/Histon3.1	p-IκBα/T-IκBα
对照组	0.042±0.013	0.545±0.287	0.321±0.077	0.183±0.012
LPS 组	0.697±0.081[a]	1.790±0.57[a]	0.594±0.049[a]	0.387±0.029[a]
LPS+替米沙坦0.01 μg/ml 组	0.563±0.214	1.432±0.203	0.653±0.085	0.453±0.012
LPS+替米沙坦0.1 μg/ml 组	0.510±0.062	1.59±0.418	0.617±0.035	0.567±0.035
LPS+替米沙坦1 μg/ml 组	0.440±0.135	0.517±0.142[b]	0.330±0.026[b]	0.393±0.065
LPS+替米沙坦10 μg/ml 组	0.183±0.101[b]	0.440±0.070[b]	0.157±0.006[b]	0.183±0.065[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组比较

2.2.2 各组总蛋白 p-ERK1/2、p-p38MAPK、p-IκBa 和核蛋白 NF-κBp65 的电泳结果 脂多糖刺激后,脂肪细胞 ERK1/2、p38MAPK 和 IκBa 蛋白磷酸化水平明显增强,而 ERK1/2、p38MAPK 和 IκBa 总蛋白表达未见明显变化,NF-κBp65 核蛋白表达也明显增强。替米沙坦干预后,大剂量(10 μg/ml)组磷酸化蛋白和核蛋白下降明显,总蛋白未见明显变化,见图2。



1:对照组;2:LPS 组;3:LPS+替米沙坦0.01 μg/ml 组;4:LPS+替米沙坦0.1 μg/ml 组;5:LPS+替米沙坦1 μg/ml 组;6:LPS+替米沙坦10 μg/ml 组

图2 Western blot 检测各组总蛋白 p-ERK1/2、p-p38MAPK、p-IκBa 和核蛋白 NF-κBp65 的表达

3 讨论

近年来,对肾素血管紧张素系统(RAS)中血管紧张素Ⅱ的研究,以及血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素Ⅱ受体(AT1)拮抗剂的应用,引发了心血管疾病、肾脏疾病乃至糖尿病治疗学的重要变革[8]。AngⅡ除了调节血流动力学作用外,还在微炎症反应中发挥重要的作用,是近年来研究的热点之一。da-Cunha 等[9]给载脂蛋白 E 缺乏(aopE-KO)大鼠皮下注射 AngⅡ,4周后用免疫组化和 RT-PCR 方法检查大鼠大动脉壁发现 E-selectin、ICAM-1、VCAM-1、MCP-l、M-CSF 及其基因表达增多,颈动脉粥样斑块的相对面积增加6倍,证明 AngⅡ可以引起大鼠体内的炎症反应,促进粥样硬化斑块的形成。我们将20只雄性 Wistar Kyoto 大鼠分为2组,分别给予安慰剂和 AngⅡ受体拮抗剂坎地沙坦口服,17周后测定血浆瘦素、脂联素、TNF-α 的蛋白和 mRNA 水平,发现坎地沙坦可以明显降低大鼠炎性因子的表达,有力地证实了 AngⅡ受体拮抗剂抗炎这一观点[4]。2006年,DREAM 研究在观察糖耐量减低的人群中雷米普利预防糖尿病的作用时发现,雷米普利治疗组平均 OGTT 2 h 血糖水平较安慰剂组显著降低[10]。有研究发现运用核因子-κB(NF-κB)阻滞剂干预人脂肪细胞后,AngⅡ刺激其产生 IL-6 和 IL-8 的作用被完全阻断,表明 AngⅡ可能通过 NF-κB 激活而发挥致炎作用[11]。有研究也发现肝星状细胞中,AT-1 受体静默可抑制 NF-κB 的活性,而 AngⅡ刺激则可使 NF-κB DNA 结合活性增强,证明 AngⅡ可以通过 NF-κB 发挥作用[12]。本实验中,我们以脂多糖刺激成熟 3T3-L1 脂肪细胞为炎症模型,观察替米沙坦干预后细胞 NF-κB 通路相关蛋白的活化水平变化。已证实,NF-κB 是一个多功能核转录因子,在静息细胞中主要以 p50-p65-IκB 构成的三聚体形式存在于细胞质中,处于无活性状态。胞外刺激信号可引起 IκB 磷酸化,三聚体分离,NF-κB 的核位置信号区暴露,并转移进入细胞核,从而启动或增强靶基因的转录。我们发现脂多糖诱导后脂肪细胞 IκB 磷酸化表达和 NF-κBp65 核蛋白表达均明显增多,血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂替米沙坦大剂量(10 μg/ml)干预则可以显著抑制这一作用,表明替米沙坦可以抑制 IκB 磷酸化和 NF-κBp65 核转位,通过 NF-κB 信号转导通路发挥抗炎作用。

2009年我们在应用高通量基因表达谱芯片研究替米沙坦对成熟脂肪细胞功能的影响时发现,MAPK 途径,即丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase)通路,与脂肪细胞分泌尤其是促炎因子的分泌有重要的联系,并提出替米沙坦可能通过 MAPK 途径而发挥对脂肪细胞以及脂肪细胞炎症因子分泌的调节作用[13]。有学者研究也发现在人脐静脉内皮细胞中 AngⅡ使 p38 磷酸化而激活 p38MAPK,且这种作用可被氯沙坦阻断[14]。MAPK 通路目前已经发现 ERK1/2、JNK、p38MAPK 等亚族,是真核生物将胞外信号转导至胞内引起细胞反应的一类重要信号系统[15]。本研究中,我们分别测定了 ERK1/2、JNK、p38MAPK 3条通路的磷酸化水平,发现脂多糖刺激成熟 3T3-L1 脂肪细胞后,可使 ERK1/2、p38MAPK 磷酸化表达增强,但 JNK 通路不受影响,替米沙坦干预则可使前二者磷酸化蛋白的表达降低,并在大剂量(10 μg/ml)时作用显著,替米沙坦可能通过 ERK1/2、p38MAPK 信号转导通路发挥抗炎作用,但是否涉及 JNK 通路有待进一步研究。

综上所述,本研究以脂多糖刺激成熟 3T3-L1 脂肪细胞为炎症模型,发现替米沙坦可以抑制脂多糖激发的 IκB 磷酸化、NF-κBp65 核转位和 ERK1/2、p38MAPK 蛋白磷酸化,证明替米沙坦致炎机制可能涉

及 MAPK-NF-κB 信号通路。这一结论为血管紧张素转换酶抑制剂和Ⅱ型血管紧张素受体(AT1)拮抗剂的临床抗炎治疗提供了新的理论依据。但我们的实验仅仅研究的是体外环境下的单一因素,与体内复杂内环境下发生的药物及代谢变化有很大的差别,所以关于机体 RAS 系统,特别是 AngⅡAT1 受体拮抗剂的抗炎机制还需要进一步研究。

参考文献:

[1] World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks[R]. Geneva: World Health Organization, 2009.
[2] Wellen K E, Hotamisligil G S. Inflammation, stress, and diabetes[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5): 1111-1119.
[3] Abuissa H, Jones P G, Marso S P, *et al*. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention for type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(5): 821-826.
[4] 窦京涛, 母义明, 陆菊明, 等. 血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂对大鼠脂肪分泌瘦素、脂联素和 TNF-α 的影响[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(2): 138-140.
[5] Poulos S P, Dodson M V, Hausman G J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010, 235(10): 1185-1193.
[6] Koh Y J, Cha D S, Ko J S, *et al*. Anti-inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells[J]. J Med Food, 2010, 13(4): 870-878.
[7] Freshney R I. Basic principles of cell culture[M]//Vunjak-Novakovic, Freshney R I. Culture of cells for tissue engineering. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2006: 3-22.
[8] Perret-Guillaume C, Joly L, Jankowski P, *et al*. Benefits of the RAS blockade: clinical evidence before the ONTARGET study[J]. J Hypertens, 2009, 27(Suppl 2): S3-S7.
[9] da-Cunha V, Tham D M, Martin-McNulty B, *et al*. Enalapril attenuates angiotensin Ⅱ-induced atherosclerosis and vascular inflammation[J]. Atherosclerosis, 2005, 178(1): 9-17.
[10] Bosch J, Yusuf S, Gerstein H C, *et al*. Effect of ramipril on the incidence of diabetes[J]. N Engl J Med, 2006, 355(15): 1551-1562.
[11] Skurk T, van-Harmelen V, Hauner H. Angiotensin Ⅱ stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(7): 1199-1203.
[12] 李旭, 张艺军, 孟莹, 等. AT-1 受体、ACE 基因静默对肝星状细胞 NF-κB 活性的影响[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(3): 402-404.
[13] 陈康, 窦京涛, 潘长玉, 等. 应用高通量基因表达谱芯片研究替米沙坦对成熟脂肪细胞的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2009, 8(5): 452-456.
[14] Guo R W, Yang L X, Li M Q, *et al*. Angiotensin Ⅱ induces NF-kappa B activation in HUVEC *via* the p38MAPK pathway[J]. Peptides, 2006, 7(12): 3269-3275.
[15] Kim E K, Choi E J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(4): 396-405.

(收稿:2011-02-25;修回:2011-04-29)
(编辑 栾 嘉)

(上接1571页)

床上剥离。对于无法显露胆总管及肝总管前壁时,则从胆囊底部开始分离,将胆囊从胆囊床剥离与镂空的胆囊三角会师。对于高度怀疑胆道变异者,行术中胆道造影。本组有1例患者,术中解剖肝十二指肠韧带前壁,见2条并行蓝色管道结构,行术中胆道造影,在胆囊壶腹部切开胆囊,将输尿管导管置入胆囊管,造影显示左右肝管汇合于十二指肠上方,胆囊管汇入右肝管。术中炎症渗出较多者放置腔引流管。

2 结果

本组98例患者均在腹腔镜下完成,无1例胆道损伤。手术时间40~130 min,平均70 min,术后住院时间4~6 d,平均5 d,全部痊愈出院。

3 讨论

本组98例患者均在急性发作下行LC,我们发现急性胆囊炎的患者胆囊淋巴结常肿大,此淋巴结位于胆囊颈部,是术中解剖胆囊三角的"航标"。我们体会在胆囊淋巴结的右下方紧贴淋巴结解剖胆囊前三角区是安全的。术中明确分辨胆囊淋巴结的方法是将胆囊三角打开,看到位于胆囊颈部呈灰褐色肿大的淋巴结即为胆囊淋巴结,若术中肿大的胆囊淋巴结妨碍解剖胆囊三角时,可将淋巴结向胆总管方向推移或剔除淋巴结,以增加胆囊三角的显露。当术中遇胆囊三角区致密黏连,难以分离时,并且肝十二指肠韧带水肿,胆总管及肝总管不易显露时,可利用肝方叶尖作为解剖标志判断胆管走向,通常左右肝管在肝方叶尖右侧0.5~1 cm汇合形成肝总管,用此解剖标志可有效避免胆道损伤。对于可疑的管道无法辨别时,可行术中胆道造影,了解胆管树的走行及有无胆道变异,准确识别胆囊管汇入胆管的位置,避免残余胆囊管过长形成"小胆囊"及过度靠近肝总管而造成胆道的局部狭窄,从而有效预防胆管损伤。在离断胆囊管前,再检查、辨认一遍胆道解剖,确认无误后再夹闭切断胆囊管。手术结束后,将干纱布置于胆囊三角区,检查有无黄染及渗血。本组98例患者采用上述方法未发生1例胆道损伤,恢复顺利,痊愈出院。

参考文献:

[1] Sicklick J K, Camp M S, Lillemoe K D, *et al*. Surgical management of bile duct injuries sustained during laparoscopic cholecystectomy: perioperative results in 200 patients[J]. Ann Surg, 2005, 241(5): 786-795.
[2] 吴青松, 刘吉佳, 谢文彪, 等. 腹腔镜胆囊切除术胆管损伤的现状分析[J]. 中华肝胆外科杂志, 2005, 11(3): 207-209.
[3] 陈建尧, 蔡秀军. 急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术79例临床分析[J]. 中国微创外科杂志, 2004, 4(1): 69-70.
[4] 裘法祖, 王健本, 张祜曾. 腹部外科临床解剖学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 217.
[5] 黄志强, 黄晓强, 宋青. 黄志强胆道外科手术学[M]. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 2010: 27.

(收稿:2011-05-15;修回:2011-05-24)
(编辑 邓强庭)