文章编号:1000-5404(2014)08-0759-05

论著

Trps1调控胆管上皮细胞上皮-间质转化的实验研究

程 哲,田 驹,郑树国 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 探讨毛发鼻指(趾)综合征1型相关基因(tricho-rhino-pharyngeal syndrome type 1,Trps1)在冷保存再灌注损伤(cold preservation reperfusion injury,CPRI)诱导人肝内胆管上皮细胞(human intrahepatic biliary epithelial cells,HIBECs)上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)中的作用。**方法** 体外模拟CPRI处理HIBECs检测上皮标志物E-cadherin、CK19,间质标志物Vimentin、α-SMA及目标基因Trps1的表达。用Trps1腺病毒或Trps1 siRNA载体转染HIBECs后,重复CPRI诱导实验,探讨Trps1对HIBECs EMT的调控作用。**结果** 随着冷保存时间的延长,上皮标志物E-cadherin、CK19 mRNA和蛋白表达持续减少($P=0.018,0.011;P=0.039,0.044$),间质标志物Vimentin、α-SMA表达持续增加($P=0.002,0.026;P=0.035,0.016$);冷保存12 h,细胞内Trps1 mRNA和蛋白表达增加($P=0.018,0.031$),其后随冷保存时间延长持续减少($P=0.026,0.009$)。相关分析显示在该过程中,Trps1与上皮标志物表达正相关($r=0.981,0.913;P=0.000,0.002$),而与间质标志物表达负相关($r=-0.711,-0.847;P=0.009,0.005$)。Trps1腺病毒转染HIBEC后,重复上述CPRI诱导实验,E-cadherin表达增加($P=0.002,0.000$),Vimentin表达减少($P=0.000,0.017$),CPRI诱导HIBECs EMT效应受到抑制;Trps1 siRNA转染HIBECs后,重复上述CPRI诱导实验,E-cadherin表达减少($P=0.032,0.044$),Vimentin表达增加($P=0.047,0.031$),加强CPRI诱导HIBECs EMT效应。**结论** 体外模拟CPRI可诱导HIBECs发生EMT,Trps1参与调控HIBECs EMT,发挥重要的拮抗作用并可能逆转该过程。

[关键词] Trps1;胆管上皮细胞;上皮-间质转化;冷保存再灌注损伤
[中图法分类号] R-331;R394.3;R657.4 [文献标志码] A

Trps1 regulates epithelial-mesenchymal transition of intrahepatic biliary epithelial cells

Cheng Zhe, Tian Ju, Zheng Shuguo (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human intrahepatic biliary epithelial cells (HIBECs) induced by cold preservation reperfusion injury (CPRI), and to study the role of tricho-rhino-pharyngeal syndrome type 1 (Trps1) in the occurrence of HIBECs EMT. **Methods** HIBECs were incubated with simulated CPR1 *in vitro*, then expressions of E-cadherin, CK19, Vimentin, α-SMA and the target gene Trps1 in HIBECs were detected by RT-PCR and Western blotting after treatment of HIBECs with CPRI. The effect of Trps1 was increased with recombinant adenovirus vector containing Trps1 gene or blocked with Trps1 siRNA, then the role of Trps1 was studied. **Results** With the prolongation of cold preservation time, the mRNA and protein expression of EMT markers, E-cadherin and CK19 was decreased ($P=0.018, 0.011; P=0.039, 0.044$), while that of Vimentin and α-SMA was significantly increased ($P=0.002, 0.026; P=0.035, 0.016$). The expression of Trps1 mRNA and protein reached its peak at 12 h ($P=0.018, 0.031$) and began to decrease at 24 and 48 h, respectively ($P=0.026, 0.009$). Trps1 was positively correlated with the epithelial markers ($r=0.981, 0.913; P=0.000, 0.002$) but negatively correlated with the mesenchymal markers ($r=-0.711, -0.847; P=0.009, 0.005$). Recombinant adenovirus vector containing Trps1 gene could up-regulate the CPRI-induced expression decrease of E-cadherin ($P=0.002, 0.000$) but down-regulate the expression increase of Vimentin ($P=0.000, 0.017$). Trps1 siRNA could down-regulate the CPRI-induced expression decrease of E-cadherin ($P=0.032, 0.044$) but up-regulate the expression increase of Vimentin and α-SMA ($P=0.047, 0.031$). **Conclusion** CPRI can induce the occurrence of HIBECs EMT. Trps1 participates in the regulation of HIBECs EMT as a key antagonistic factor, and may reverse the process.

[基金项目] 国家自然科学基金(30972948)
[通信作者] 郑树国,电话:(023)68765806,E-mail:shuguozh@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140303.1009.001.html(2014-03-03)

[**Key words**] Trps1; biliary epithelial cells; epithelial-mesenchymal transition; cold preservation reperfusion injury

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972948). Correspondence author: Zheng Shuguo, Tel: 86-23-68765806, E-mail: shuguozh@gmail.com

非吻合性胆管狭窄(nonanastomotic biliary stricture, NABS)是目前肝移植术后胆道并发症(biliary complication, BC)的主要类型之一,可致进行性胆汁性肝硬化、移植物失功能、再次肝移植及死亡,是制约肝移植疗效进一步提高的瓶颈。其病理基础是胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)损伤后的无效或过度修复所致的移植肝胆管纤维化。研究发现,冷保存再灌注损伤(cold preservation reperfusion injury, CPRI)是移植肝胆管纤维化发生的独立影响因素[1],但其发病机制尚待进一步阐明。

我们既往的研究证实肝移植术后胆管纤维化发生过程中存在BECs上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象[2]。最近的研究发现,毛发鼻指(趾)综合征1型相关基因(tricho-rhino-pharyngeal syndrome type 1, Trps1)参与调控多种上皮细胞EMT过程[3-6],是上皮细胞向间质细胞转化重要的拮抗因子。但Trps1是否参与BECs EMT过程及其作用目前尚少见报道。本研究旨在观察Trps1在体外模拟CPRI诱导BECs EMT过程中的作用,为进一步研究移植肝胆管纤维化的分子机制和防治策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及体外模拟CPRI处理人肝内胆管上皮细胞

人肝内胆管上皮细胞(human intrahepatic biliary epithelial cells, HIBECs P5100)购于美国Sciencell Research Laboratories,保存于本实验室。细胞培养具体方法参照文献[7]进行。至细胞处于对数生长期时,0.25%胰蛋白酶消化、传代。

体外模拟CPRI处理HIBECs,4 ℃ UW液中充氮气保存12、24、48 h模拟冷保存阶段,转移至37 ℃正常含血清培养基中孵育1 h模拟再灌注阶段,具体方法和步骤参照文献[8]进行。于倒置显微镜下观察,选择合适时相进行实验。

1.2 细胞爬片的制备及Trps1免疫组化检测

取消毒干燥盖玻片分别放入6孔培养板内,滴入数滴含血清培养液,轻压盖玻片,使盖玻片牢固粘贴于培养孔底。以1×10^5/mL细胞密度将细胞接种于6孔板培养孔内,加入10%胎牛血清普通培养液3 mL/孔,5% CO_2、37 ℃饱和湿度培养。待细胞贴附玻片后,移液器吸干培养液,D-Hanks液清洗,加入丙酮溶液,4 ℃固定10 min,然后取出晾干。使用二步法对细胞爬片进行Trps1免疫组化染色,应用DAB溶液显色。自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。

1.3 定量RT-PCR

RT-PCR扩增,根据Rever Tre-Ace-a-逆转录试剂盒说明进行逆转录反应,从GenBank中检索Trps1、E-cadherin、CK19、Vimentin、α-SMA基因,采用Gene Tool设计引物,同时设计内参β-actin,基因引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物序列及反应条件见表1。具体方法和步骤参照文献[7]进行。

表1 引物序列及产物大小

基因	引物序列	产物大小(bp)
Trps1	正义链: 5′TTGAGAGAGACACTACATGAC-3′	256
	反义链: 5′-TGTTAAAGATACTTTTTTCCC-3′	
E-cadherin	正义链:5′-GGACCACAGGCATGCACCACTAC-3′	162
	反义链:5′-GGCAGGTGCAGTGGCTCATGT-3′	
CK-19	正义链:5′-CCCGCGACTACAGCCACTACTAC-3′	176
	反义链:5′-GTCGGCCTCCACGCTCATG-3′	
Vimentin	正义链:5′-CCAGGCAAAGCAGGAGTCCAC-3′	247
	反义链:5′-GGCCATCTTAACATTGAGCAGGT-3′	
α-SMA	正义链:5′-GGGCTAAGTTCTGTGGGGTGTGC-3′	138
	反义链:5′-GGCAGGCACAGGTCTTGATGAA-3′	
β-actin	正义链:5′-CCATGTACGTTGCTATCCTGGC-3′	289
	反义链:5′-ATCTCTTGCTCGAAGTCCAGGG-3′	

1.4 Western blot检测

细胞裂解缓冲液裂解HIBECs提取总蛋白。考马斯亮蓝法定量测定目标蛋白Trps1及上皮标志物E-cadherin、CK19,间质标志物Vimentin、α-SMA的表达。具体方法和步骤参照文献[7]进行。

1.5 划痕实验

将HIBECs接种到6孔板中,待细胞生长达到饱和密度后,用1 mL移液器枪头在孔内划痕,划痕前2 h加入1 μg/mL丝裂霉素C抑制细胞增殖,镜下观察确保每孔内划痕宽度一致,更换培养基室温下继续培养,12 h后测量损伤缘细胞迁移距离,比较平均线性速度。

1.6 构建人Trps1腺病毒载体并感染HIBECs

将HIBECs按每孔细胞数2×10^5个接种至6孔板,培养24 h后,待细胞完全贴壁生长至60% ~80%融合时,以感染复数(MOI)为80的Trps1重组腺病毒(本实验室保存)感染HIBECs,感染2 h后更换含血清的RPMI1640完全培养基继续培养48 h,RT-PCR检测转染后HIBECs中Trps1 mRNA表达。具体方法和步骤参照文献[2]进行。

1.7 Trps1 siRNA转染HIBECs

将HIBECs按每孔细胞数2×10^5个接种至6孔板,培养24 h后,细胞的汇合度达到80% ~85%时进行转染。在250 μL无血清无抗生素的RPMI1640培养基中加入20 μL Trps1 siRNA寡聚物(Santa Cruz, sc106642),轻轻混匀,37 ℃、5% CO_2培养箱孵育6 h,更换含血清的RPMI1640培养基,继续培养24 h,RT-PCR检测转染后HIBECs中Trps1 mRNA表达。

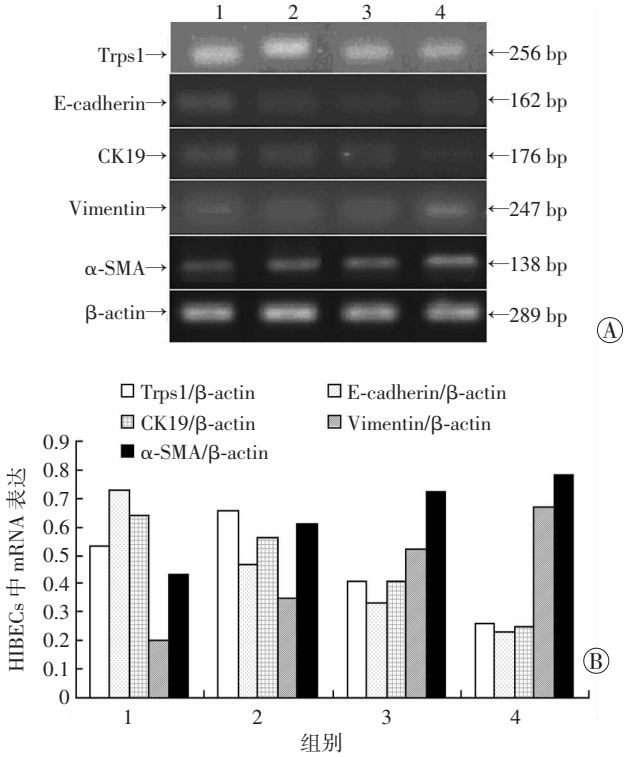
1.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,两组间比较选用独立样本t检验,多组间比较选用χ^2检验。

2 结果

2.1 体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后 Trps1 表达变化

CPRI 处理 HIBECs(模拟再灌注时间均为 1 h),CP 12 h 组 Trps1 mRNA 转录及蛋白表达较未处理对照组 HIBECs 明显增加($P=0.018,0.031$);CP 24、48 h 组 Trps1 mRNA 转录及蛋白表达较对照组明显减少($P=0.026,0.009$),且随着冷保存时间的延长(CP 24 h→48 h),减少的趋势越明显(图 1、2)。



A:RT-PCR 检测结果;B:Trps1、E-cadherin、CK19、Vimentin、α-SMA mRNA 半定量分析结果　1:对照组;2:冷保存 12 h 再灌注 1 h 组;3:冷保存 24 h 再灌注 1 h 组;4:冷保存 48 h 再灌注 1 h 组

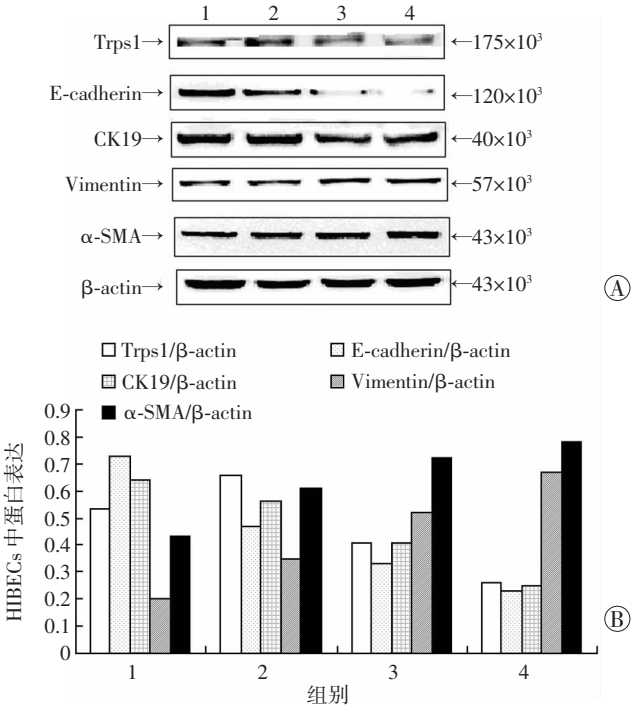
图 1　RT-PCR 检测 CPRI 对 HIBECs Trps1 及 EMT 相关标志物 mRNA 表达

2.2 体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后上皮、间质标志物表达变化

CPRI 处理 HIBECs(模拟再灌注时间均为 1 h),CP 12、24、48 h 各组 E-cadherin mRNA 转录及蛋白表达较未处理对照组明显减少($P=0.018,0.011$)CK19 mRNA 转录及蛋白表达较对照组明显减少($P=0.039,0.044$),随着冷保存时间的延长(CP 12 h→24 h→48 h),减少的趋势越明显;Vimentin mRNA 转录及蛋白表达较对照组明显增加($P=0.002,0.026$)、α-SMA mRNA 转录及蛋白表达较对照组明显增加($P=0.035,0.016$),,随着冷保存时间的延长(CP 12 h→24 h→48 h),增加的趋势越明显。提示体外模拟 CPRI 诱导 HIBECs 发生 EMT,且冷保存时间是该过程的影响因素(图 1、2)。

2.3 体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后 Trps1 表达与上皮、间质标志物表达变化的相关性分析

对定量 PCR 测定 Trps1、上皮标志物(E-cadherin、CK19)及间质标志物(Vimentin、α-SMA)mRNA 表达数值结果进行相关分析(表 2)提示,Trps1 与上皮标志物表达显著正相关,与间质标志物表达显著负相关,证实 Trps1 参与了 HIBECs EMT 过程,且可能是该过程的拮抗因子。



A:Western blot 检测结果;B:Trps1、E-cadherin、CK19、Vimentin、α-SMA 蛋白半定量分析结果　1:对照组;2:冷保存 12 h 再灌注 1 h 组;3:冷保存 24 h 再灌注 1 h 组;4:冷保存 48 h 再灌注 1 h 组

图 2　Western blot 检测 CPRI 对 HIBECs Trps1 及 EMT 相关标志物蛋白表达

表 2　Trps1 mRNA 表达与 EMT 标志物 mRNA 表达的相关性分析

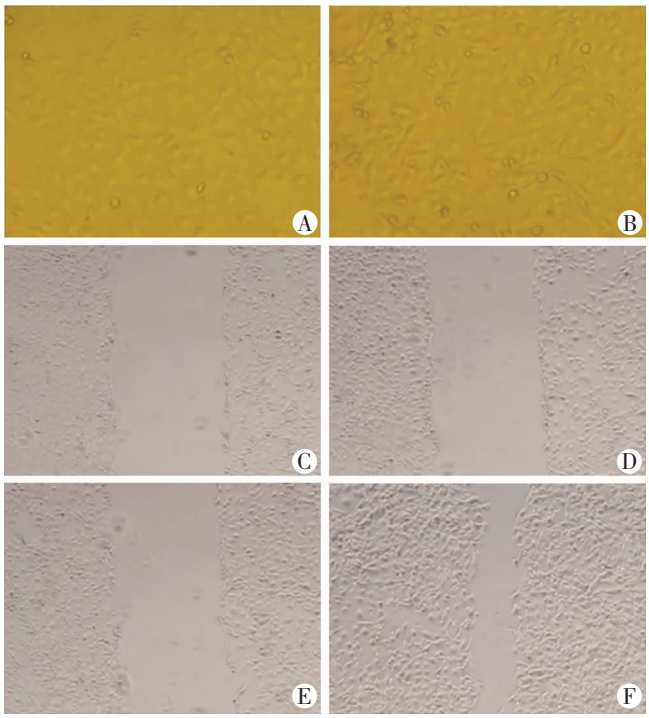
	相关系数 r	可决系数 r^2	F 检验值	P 值	回归方程
Trps1-E-cadherin	0.981	0.962	251.506	0.000	$t=0.596+0.42e$
Trps1-CK19	0.913	0.834	41.918	0.002	$t=0.326+0.42c$
Trps1-Vimentin	−0.711	0.506	10.252	0.009	$t=2.898-1.26v$
Trps1-α-SMA	−0.847	0.717	20.959	0.005	$t=1.505-1.13s$

2.4 体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后细胞形态及迁移能力的变化

体外模拟 CPRI(冷保存 12 h、再灌注 1 h)处理 HIBECs 后,细胞形态由卵圆石样变为梭形居多的成纤维细胞样;划痕 12 h 两组细胞的迁移速度依次为(8.3±2.2)、(32.5±4.7)μm/h,经 t 检验,CPRI 组迁移能力明显强于正常细胞($P=0.02$)(图 3)。

2.5 Trps1 腺病毒或 Trps1 siRNA 转染 HIBECs 后对 CPRI 诱导的 HIBECs EMT 过程的影响

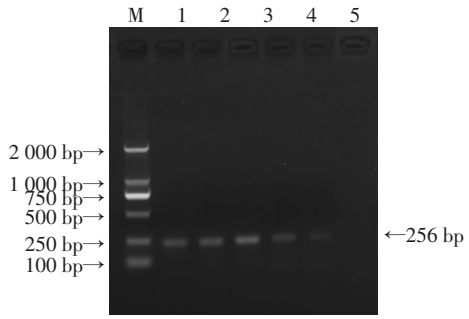
mRNA 电泳结果显示 Trps1 腺病毒转染组目的基因 mRNA 表达较未转染组及空病毒转染对照组增加,Trps1 siRNA 转染组目的基因 mRNA 表达较未转染组及无关序列 siRNA 转染对照组减少(图 4),提示 Trps1 腺病毒及 Trps1 siRNA 均成功转染 HIBECs,为进一步干预实验奠定了基础。



A:正常培养的 HIBECs(×200);B:体外模拟冷保存 24 h、再灌注 1h 处理 HIBECs(×200);C:正常培养的 HIBECs 划痕 0 h(×100);D:体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后划痕 0 h(×100);E:正常培养的 HIBECs 划痕 12 h(×100);F:体外模拟 CPRI 处理 HIBECs 后划痕 12 h×100)

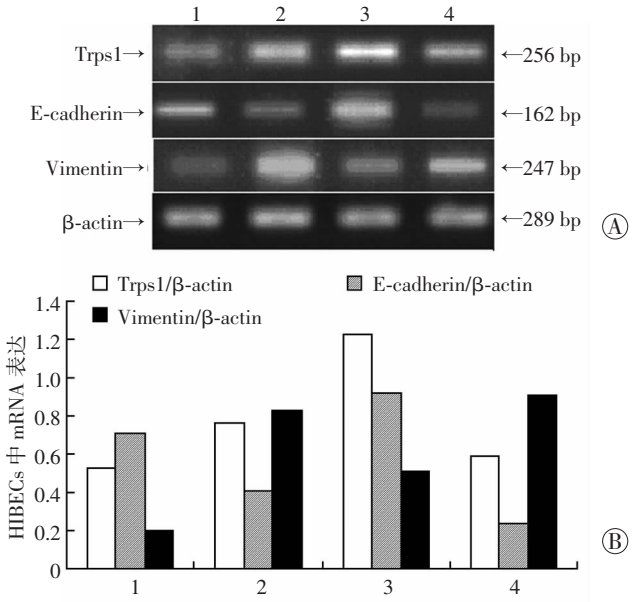
图3 划痕实验检测 CPRI 对 HIBECs 细胞迁移能力的影响 (LM)

体外模拟 CPRI(冷保存 24 h、再灌注 1 h)处理腺病毒转染组 HIBECs 后,上皮标志物 E-cadherin mRNA 转录及蛋白表达较未转染组明显增加($P=0.002$,0.000),间质标志物 Vimentin mRNA 转录及蛋白表达较未转染组明显减少($P=0.000$,0.017),CPRI 诱导的 EMT 过程受到抑制;而体外模拟 CPRI(冷保存 24 h、再灌注 1 h)处理 siRNA 转染组 HIBECs 后,上皮标志物 E-cadherin mRNA 转录及蛋白表达较未转染组明显减少($P=0.032$,0.044),间质标志物 Vimentin mRNA 转录及蛋白表达较未转染组明显增加($P=0.047$,0.031),加强了 CPRI 诱导的 EMT 过程(图5、6)。



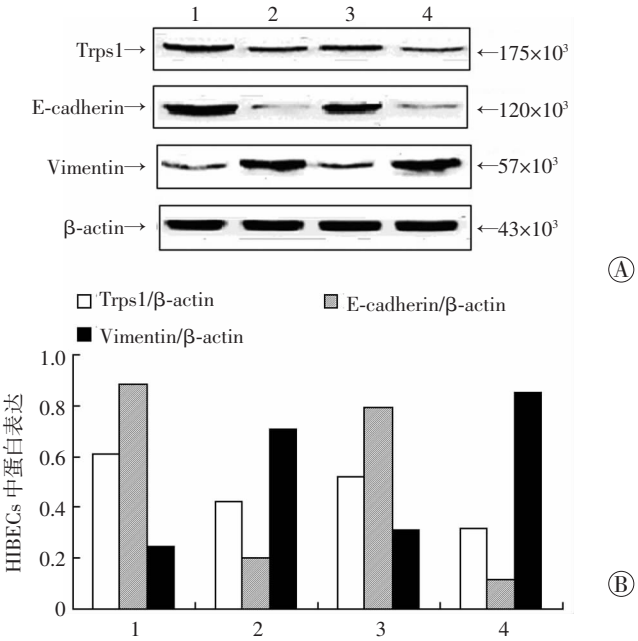
M:标准(2 000);1:未转染组 HIBECs;2:HIBECs + 空病毒转染对照组;3:HIBECs + Trps1 腺病毒转染组;4:HIBECs + 无关序列 siRNA 转染对照组;5:HIBECs + Trps1 siRNA 转染组

图4 RT-PCR 检测 Trps1 腺病毒及 Trps1 siRNA 转染 HIBECs 电泳结果



A:RT-PCR 检测结果;B:Trps1、E-cadherin、Vimentin mRNA 半定量分析结果 1:HIBECs;2:HIBECs + CPRI;3:HIBECs + Trps1 腺病毒 + CPRI;4:HIBECs + Trps1 siRNA + CPRI

图5 RT-PCR 检测 HIBECs 内 Trps1 表达变化对 CPRI 诱导的 EMT 过程的影响



A:Western blot 检测结果;B:Trps1、E-cadherin、Vimentin 蛋白半定量分析结果 1:HIBECs;2:HIBECs + CPRI;3:HIBECs + Trps1 腺病毒 + CPRI;4:HIBECs + Trps1 siRNA + CPRI

图6 Western blot 检测 HIBECs 内 Trps1 表达变化对 CPRI 诱导的 EMT 过程的影响

3 讨论

EMT 是指上皮细胞在特定微环境条件下向间充质细胞的转分化现象,近年研究发现 EMT 在创伤修复及器官纤维化中发挥重要作用。既往研究[9-11]证实,

肝移植术中供肝冷保存时间的延长加重胆道内皮损伤,是术后胆道狭窄的一个重要原因,机制可能是CPRI诱导BECs发生EMT。本研究发现,体外模拟CPRI处理BECs后,细胞形态由卵圆石样变为梭形居多的成纤维细胞样;上皮标志物表达减少,而间质标志物表达增加;划痕实验中CPRI处理组BECs迁移速度加快。以上实验结果从细胞形态、标志物表达及运动能力三方面证实BECs经CPRI处理后具有了部分间质细胞的属性,即CPRI可诱导BECs发生EMT。

EMT具有可逆性,当微环境条件改变或致病因素消除后去分化的间叶细胞又可转化为上皮细胞,即MET[12]。EMT/MET的平衡决定了创伤、炎症组织修复的转归和结局。创伤、炎症后期,若致炎因子持续存在,EMT持续强化,组织和器官发生纤维化;反之,若致炎因子消除,MET进程强于EMT,纤维化逆转、创伤愈合。EMT或MET过程受多种信号分子调控,形成复杂的调控网络;而同一信号分子在不同器官EMT或MET过程中所起的作用可以不同。Trps1属于非典型的GATA转录因子家族成员,通过与目标基因的GATA序列特异性结合,竞争性抑制GATA转录子家族其他成员激活的目标基因表达[13]。最新的研究发现,Trps1可对机体内胚胎发育、肿瘤侵袭转移及器官纤维化过程中多种上皮组织和细胞的EMT效应起关键的负向调控作用。如单侧输尿管结扎小鼠肾纤维化模型中,杂合子Trps1敲除(Trps1 +/-)小鼠较野生型小鼠肾小管上皮细胞出现向间质细胞更高的转化率,形成更严重的肾纤维化[14];而在成年大鼠急性肾损伤模型(双侧肾动脉夹闭)中,Trps1促进肾脏修复再生[15]。但Trps1基因是否参与调控BECs EMT过程尚少见报道。本研究发现细胞内Trps1表达与CPRI诱导BECs EMT进展程度负相关,在该过程中检测到Trps1表达先增加后持续减少,我们分析:冷保存≤12 h,BECs内Trps1表达增加可能是CPRI激活细胞内反应性代偿保护机制,上调Trps1表达以抑制EMT进展;随着冷保存时间继续延长,代偿机制效能降低,Trps1表达持续下降,BECs迅速发生EMT。为进一步证实Trps1基因的作用,我们用Trps1腺病毒或Trps1 siRNA载体转染BECs,上调或干扰细胞内Trps1表达,重复CPRI诱导实验,发现EMT进程分别被抑制或加强。本研究结果与Trps1对机体内其他种类上皮组织和细胞EMT的负向调控作用相一致。

综上所述,本研究首次证实Trps1因子参与调控CPRI诱导的BECs EMT过程,并发挥重要的拮抗作用。由于CPRI是移植肝胆管纤维化的独立影响因素,Trps1可能成为治疗肝移植术后非吻合口胆管狭窄的新靶点。但该研究结果尚需在动物实验中进一步验证。

参考文献:

[1] Park J B, Kwon C H, Choi G S, *et al*. Prolonged cold ischemic time is a risk factor for biliary strictures in duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation[J]. Transplantation, 2008, 86(11): 1536-1542.

[2] 田驹, 程哲, 郑树国. 构建人三叶因子3腺病毒载体对胆管上皮细胞迁移的调控作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(4): 297-301.

[3] Gai Z, Zhou G, Itoh S, *et al*. Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(11): 2403-2411.

[4] Malik T H, Von-Stechow D, Bronson R T, *et al*. Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes[J]. Mol and Cel Biol, 2002, 22(24): 8592-8600.

[5] Chen J Q, Bao Y, Litton J, *et al*. Expression and relevance of TRPS-1: a new GATA transcription factor in breast cancer[J]. Horm Cancer, 2011, 2(2): 132-143.

[6] Chang G T, Steenbeek M, Schippers E, *et al*. Characterization of a zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells[J]. J Nat Can Inst, 2000, 92(17): 1414-1421.

[7] 赵礼金, 杨日高, 程龙, 等. 肝内胆管上皮细胞上皮-间叶转化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(3): 214-219.

[8] Rauen U, Elling B, de-Groot H. Injury to cultured liver endothelial cells after cold preservation: mediation by reactive oxygen species that are released independently of the known trigger hypoxia/reoxygenation [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(3): 392-400.

[9] Que X, Debonera F, Xie J, *et al*. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model [J]. J Surg Res, 2004, 116(2): 262-268.

[10] Sanchez-Urdazpal L, Gores G J, Ward E M, *et al*. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation [J]. Hepatology, 1992, 16(1): 49-53.

[11] Zheng S, Feng X, Qing D, *et al*. The tolerance time limits of biliary tracts of liver grafts subjected to warm ischemia and cold preservation: an experimental study in swine[J]. Transplant Proc, 2008, 40(5): 1629-1634.

[12] Acloque H, Adams M S, Fishwick K, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1438-1449.

[13] Malik T H, Shoichet S A, Latham P, *et al*. Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1[J]. EMBO J, 2001, 20(7): 1715-1725.

[14] Gai Z, Zhou G, Gui T, *et al*. Trps1 haploinsufficiency promotes renal fibrosis by increasing Arkadia expression[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(9): 1468-1476.

[15] 黄坤, 张建国, 李开龙, 等. Trps1在大鼠肾脏缺血再灌注损伤修复过程中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1158-1161.

(**收稿**:2014-01-20;**修回**:2014-02-13)

(编辑 王 红)