技术与方法 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.008

联用酶反应过程分析法和初速度法测定谷胱甘肽-S-转硫酶活性

廖 娟[1],赵利娜[2],龙高波[2],杨晓兰[2],蒲 军[2],廖 飞[2]

(重庆医科大学 1. 附属永川医院中心实验室,重庆 402160;2. 检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:考察联用谷胱甘肽-S-转硫酶(Glutathione-S-transferase,GST)产物抑制反应过程分析法和初速度法测定 GST 活性的有效性。方法:阳离子交换层析纯化猪肝碱性 GST 同工酶。在 25℃,用 1.0 mmol/L 2,4-二硝基氯苯(1-Chloro-2,4-dinitrobenzene,CDNB)和 50.0 mol/L 谷胱甘肽(Glutathione,GSH)跟踪产物在 340 nm 吸收的变化。5.0 min 内底物消耗比例低于设定界限时测定初速度;否则,用以反应时间为自变量且包含产物抑制的积分速度方程分析反应过程确定最大反应速度,再换算成优化 GSH 浓度下的初速度。结果:优化 GST 产物抑制常数后,只要被分析数据中 GSH 消耗 55%以上,所得最大反应速度对被分析数据范围不敏感。用 48 mol/L GSH 将最大反应速度换算成初速度,联用策略所得 GST 活性的线性下限略高于初速度法,而线性上限提高 4 倍。结论:用积分速度方程分析酶反应过程并优化最大速度换算成初速度所需底物浓度,联用策略测定酶活性线性范围更宽,有望成为测定酶活性的新方法。

【关键词】谷胱甘肽-S-转硫酶;积分速度方程;反应曲线;联用策略;线性范围

【中国图书分类法分类号】Q55 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-17

Integration of kinetic analyses of reaction curve with the classical initial rate method to measure glutathione-S-transferase

LIAO Juan[1],ZHAO Li-na[2],LONG Gao-bo[2],YANG Xiao-lan[2],PU Jun[2],LIAO Fei[2]

(1. Central of Laboratory,Affiliated Yongchuan Hospital;2. Key Laboratory of Medical Laboratory Diagnostics of the Education Ministry,College of Laboratory Medicine,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*:To test the effectiveness of an integration strategy for measuring activities of glutathione-S-transferase (GST) that suffers strong product inhibition. *Methods*: The alkaline isozyme of GST was purified from porcine liver by ion chromatography. GST reaction curves were monitored by absorbance at 340 nm with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 1.0 mmol/L and glutathione(GSH) at 50.0 μmol/L.When substrate consumption percentages were below the preset threshold,the classical initial rates were determined;otherwise,the maximal reaction rates were estimated by kinetic analyses of reaction curves using an integrated rate equation that employs the predictor variable of reaction time and considers product inhibition,and were then converted into initial rates at an optimized initial GSH concentration. *Results*:The maximal reaction rates of GST were resistant to variations in ranges of data as long as the product inhibition constant was optimized and the data under analyses covered the consumption of 55% GSH. By converting the maximal reaction rates into initial rates at 48 μmol/L GSH,the integration strategy had a lower limit of linear response slightly higher than that of the classical initial rates,while an upper limit of linear response that was about four times higher than that of the classical initial rates. *Conclusion*:By using the integrated rate equation for kinetic analysis of enzyme reaction process and an optimized substrate concentration to convert the maximal rates into initial rates,the integration strategy had wider linear ranges,and can potentially be a desirable universal method to measure enzyme activities.

【Key words】glutathione-S-transferase;integrated rate equation;reaction curves;integration strategy;linear range

测定血清酶和免疫分析标记酶的活性都需测量范围尽可能宽的方法。初速度法测定酶活性需足够高底物浓度才能有较好线性范围,但底物浓度易受到其溶解度、抑制性杂质及成本等因素限制,多数条件下酶活性可测范围不够理想。已报道多种改进方法,但实践中因可靠性低而未得到应用[1-3]。最近发现将初速度法与酶反应过程分析法联用,在中等底物浓度下可将酶活性测量范围拓宽到初速度法的数倍,且单次分析效率与初速度法相当[4-8]。而且,拓宽测量范围可避免对高浓度样品的稀释而提高总体分析效率。已证实,此联用策

作者介绍:廖 娟(1986-),女,硕士,
研究方向:体外诊断与药物筛选生物技术。
通信作者:廖 飞,男,教授,Email:liaofeish@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30200266);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(编号:NCET-09-928)。

略用于有底物激活的胆碱酯酶[5,6]、底物抑制的血清 γ-谷氨酰基转移酶[7]、偶联乳酸脱氢酶的谷丙转氨酶[8]，都能显著拓宽在较低底物浓度下的可测量酶活性范围。

部分酶反应受到产物的强烈抑制。谷胱甘肽-S-转硫酶（Glutathione-S-transferase，GST）催化反应基本不可逆，但存在显著产物抑制。此前发现用考虑产物抑制以反应时间为自变量的积分速度方程分析 GST 反应过程可预测反应终点的产物吸收[9]；但初速度法和动力学过程分析法能否联用测定存在强烈产物抑制的 GST 活性还不明确。猪肝富含 GST；其碱性 GST 同工酶含量较低但对谷胱甘肽（Glutathione，GSH）亲和力较低而对另一个底物 2，4-二硝基氯苯（1-Chloro-2，4-dinitrobenzene，CDNB）亲和力很高[9]，便于用低于其米氏常数（K_m）的 GSH 浓度考察此联用策略的可靠性。本文以猪肝碱性 GST 同工酶为模型，考察联用策略在低浓度 GSH 下测定活性拓宽其测量范围的有效性。

1 材料和方法

1.1 主要化学试剂和材料

还原性谷胱甘肽、2，2-双（4-硝基-2-羧基）二硫化物[5，5'-Dithio bis-(2-nitrobenzoic acid，DTNB)]购自 Sigma 公司；CDNB 购自ICN；磷酸纤维素 P11 购自 Whatman；其余试剂为国产分析纯。紫外可见分光光度计（UV-7054）购于上海欣茂仪器有限公司。

1.2 猪肝碱性 GST 同工酶制备

将新鲜猪肝用 10.0 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 6.8，含 250 mmol/L 蔗糖，1.0 mmol/L EDTA，0.50 mmol/L DTT）按 1:2 匀浆；离心后上清用 45%~85%硫酸铵分级；磷酸纤维素P11柱用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.8）平衡，沉淀用此缓冲液溶解并对此缓冲液透析后上柱，缓冲液洗去疏松结合蛋白，再用含 0.20 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱活性部分。在 0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.5）中 25℃下，用 0.20 mmol/L GSH 和 1.0 mmol/L CDNB 测酶活性，据 340 nm 吸收变化速度，按 9.6 mmol/(L·cm)消光系数计算产物生成速度[9]。每分钟生成 1 μmol 产物酶量为一个单位（U）。此法所得猪肝 GST 样品比活性大于 1.8 U/mg；分析实现数据发现其动力学行为属于单一酶，可作为样品分析其催化反应的产物抑制动力学过程测定其最大反应速度（V_m）。

1.3 GST 反应过程监测和活性测定

反应体系为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（pH 6.5）2.0 ml，50 μl CDNB 乙醇溶液（48 mmol/L，终浓度为 1.0 mmol/L），恰当稀释样品共 0.35 ml，总体系 2.4 ml。用未加 GSH 的溶液调节吸收为零，以保障全部底物反应后欣茂 UV7504 分光光度计仍可测吸收且按照吸收推算的产物浓度可靠，而且能从吸收准确推算产物抑制浓度以考虑其抑制作用；加 GST 启动反应后延迟 30 s，用厂家提供的软件在兼容机上以 10 s 间隔连续记录吸收变化，直到启动反应后记录时间达到 10 min[4-8]。

1.4 GST 反应过程分析方法

GSH 低于100 μmol/L时GST反应为乒乓机制[10,11]。在 GSH 不高于 50 μmol/L 而 CDNB 为 1.0 mmol/L 时 GST 可近似为单底物反应。将乒乓机制的微分速度方程积分成以反应时间为自变量的形式，以反应体系最大产物吸收（A_m）为非线性参数，用于拟合启动反应 40 s 后 6 个以上吸收变化大于0.003 的数据，搜索对应最好拟合 A_m 和 V_m。所需以反应时间为自变量积分速度方程见结果与讨论部分。

为将酶反应过程分析法与初速度法联用测定酶活性，实验测定时初始 GSH 浓度为 50 μmol/L 而初始 CDNB 浓度为 1.0 mmol/L[4-7]。测定初速度时，需酶反应达到稳态，此时底物浓度已低于预设初始底物浓度。初步分析发现用 50 μmol/L GSH时，GST 反应体系达到稳态后 GSH 浓度大多低于 48 μmol/L GSH。因此，分析反应过程所得 V_m 按对应单底物酶的米氏方程，换算成 48 μmol/L GSH 下的初速度。初速度法测定 GST 只分析启动反应后 30~60 s 间的数据。

1.5 程序设计

在 PCFenzyme 中添加分析 GST 反应过程的子程序（可在 http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.11.016 下载）[5]。将每条反应曲线记录成一个文本文件，用关键词标识参数用于程序读入，在主窗口绘制反应曲线并输入所需产物抑制常数（产物同 GST 的解离常数，Kiq），其余参数从记录数据的文本文件中读入，或直接包含在子程序中。非线性调节最大产物吸收的步长为 0.001。以 F 检验测量拟合优度。结果输出到主窗口或独立的文本文件保存。

1.6 统计分析

以回归分析线性响应部分所得回归估计标准差 3 倍为可测量的理论检测限，偏离线性响应不超过回归估计标准差 2 倍的最大可测值为线性上限，偏离线性响应不超过回归估计标准差两倍的最小可测值为线性下限。结果为均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$），t 检验比较差异，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 反应过程分析法测定 GST 活性

对 GST 反应体系，其一个底物浓度需优化为另一个底物浓度的 10 倍以上才能将其反应简化为单底物反应，从而将其微分速度方程积分成以反应时间为自变量的形式用于拟合反应曲线。令 GST 反应体系的 CDNB 浓度为 C，GSH 浓度为 B，且 C 大于 B 的 10 倍，据文献可得 GST 反应微积分速度方程 Eq.(1)[10,11]：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_{mb}}{V_m}\times\left(1+\frac{K_{ib}\times K_{ma}\times Q}{K_{iq}\times K_{mb}\times C}\right)\times\frac{1}{B}+\frac{1}{V_m}\times\left\{1+\frac{Kma}{C}\times\left(1+\frac{Q}{Kiq}\right)\right\} \quad (1)$$

将Eq.(1)转换为(2)：

$$\frac{V_m}{V}=\frac{K_{mb}}{B}+\frac{K_{ib}\times K_{ma}\times Q}{C\times B\times K_{iq}}+1+\frac{K_{ma}}{C}+\frac{K_{ma}\times Q}{C\times K_{iq}} \quad (2)$$

其中 $V=\frac{\delta A}{\varepsilon\times\delta t}$，$Q=\frac{(A-A_0)}{\varepsilon}$，$Qm=\frac{(A_m-A_0)}{\varepsilon}$，$B=Q_m-Q$。定义下列符号：

$$M_1=\frac{K_{ma}}{\varepsilon\times K_{iq}}$$

$$M_2=K_{ma}-\frac{K_{ib}\times K_{ma}}{K_{iq}}+C-\frac{K_{ma}\times A_m}{\varepsilon\times K_{iq}}-\frac{K_{ma}\times A_0}{K_{iq}\times\varepsilon}$$

$$M_3=K_{ma}\times A_m+\varepsilon\times K_{mb}\times C+C\times A_m-\frac{K_{ib}\times K_{mb}\times A_0}{K_{iq}}-\frac{K_{ma}\times A_m\times A_0}{K_{iq}\times\varepsilon}$$

将上述常数代入Eq.(2)得：

$$\frac{\delta A}{\varepsilon\times V_m\times\delta t}=\frac{C\times(A-A_m)}{M_1\times A^2+M_2\times A-M_3} \quad (3)$$

将Eq.(3)进行变量分离得：

$$\frac{M_1\times A^2+M_2\times A-M_3}{A-A_m}\times\delta A=C\times\varepsilon\times Vm\times\delta \quad (4)$$

将Eq.(4)左边积分，并赋给变量Y得到：

$$Y=\frac{M_1}{2}\times(A-A_m)^2+(2\times M_1\times A_m+M_2)\times(A-A_m)+(M_1\times Am^2+M_2\times A_m-M_3)Ln|A-A_m| \quad (5)$$

因此，对Eq.(4)两边达到稳态反应后数据积分得：

$$Y=C\times\varepsilon\times V_m\times(t-T_{lag})=a+b\times t \quad (6)$$

公式中所用符号的意义分别为：

Q：GSH 与 CDNB 的产物浓度；Q_m：最大产物浓度；

K_{mb}：GSH 解离常数；K_{ma}：CDNB 解离常数；

K_{iq}：产物的抑制常数（产物 Q 的解离常数）；

K_{ib}：GSH 的解离常数；ε：产物与 CDNB 的差摩尔消光系数；

A：反应体系 340 nm 吸收；A_m：反应体系最大产物吸收；

猪肝碱性 GST 同工酶同产物亲和力 K_{iq} 未知，但其对 GSH 的 K_m 约 0.21 mmol/L，对 CDNB 的 K_m 约 62 mol/L[9]，都与文献报道猪肝碱性 GST 同工酶动力学参数一致[10,11]。所以，在 Eq.(6)中优化 K_{iq} 而其余动力学参数取文献值，以 A_m 为非线性参数将数据按 Eq.(5)转换成 Y，再用 Eq.(6)线性回归拟合 Y 随时间变化，以 CDNB 浓度为常数从斜率 b 中换算出 GST 的 V_m；此即反应过程分析法测定 GST 的 V_m。

2.2 分析 GST 反应过程测定 V_m 所需条件的优化

代表性 GST 反应曲线如图 1。分析猪肝碱性 GST 反应过程预测最大产物吸收时，将 K_{iq} 设在 4.0 μmol/L 预测准确度最高[9]。在分析 GST 反应过程测定最大反应速度时将 K_{iq} 设定在 4.0 μmol/L，所分析数据中只要终点的 GSH 浓度低于起点 GSH 浓度 45%且可靠记录来自产物的吸收，测定 V_m 对被分析数据范围变化不敏感。分析图 1 中 GST 反应过程，将 K_{iq} 设定在 10.0 μmol/L 或者 1.0 μmol/L，在所示底物消耗比例变化范围内测定 V_m 的变化仍然小于 10%。但当将 K_{iq} 设定在 100.0 μmol/L 以上或者 0.1 μmol/L 以下时，分析图 1 中所示范围的数据所得 V_m 变化大于 20%。可见，分析 GST 反应过程测定其 V_m 所要求的最低底物消耗比例略低于 50%；预设 K_{iq} 对测定 V_m 影响较小；将 K_{iq} 设定在 4.0 μmol/L，分析很宽范围的反应过程也能得到可靠的 V_m。

2.3 实现联用所需反应时间和 V_m 换算成初速度 GSH 浓度

实验条件下 GSH 浓度低，故初速度反应时间短而上限低（图 2），其上限和下限间比值小于 10 倍。分析反应开始 40 s 以后且记录 6.0 min 内数据，所得 V_m 按设定参数换算成初速度后也同酶量成正比（图 2），其线性上限和可测下限间比值约 15 倍。用 6.0 min 内的数据进行分析，由 V_m 换算所得初速度的可测下限低于初速度法的线性响应上限。

GST 对 GSH 的 K_m 对从 V_m 换算所得初速度影响小，但预设 GSH 浓度则对换算所得初速度影响大。此前发现实现联用所需底物浓度约为初始浓度 93%[4-7]。在此参考值附近逐步调节预设 GSH 浓度，发现预设 GSH 浓度为 48 μmol/L 时交叉区域内 2 种方法所得 GST 活性无统计差异，且 2 种方法的响应曲线斜率也无统计差异。所以将 GSH 设定在 48 μmol/L 将所得 V_m 换算成初速度，以实现 2 种方法联用。

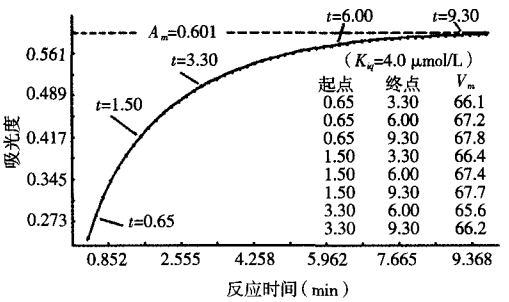


图 1 GST 反应过程及被分析数据范围对测定 V_m 的影响

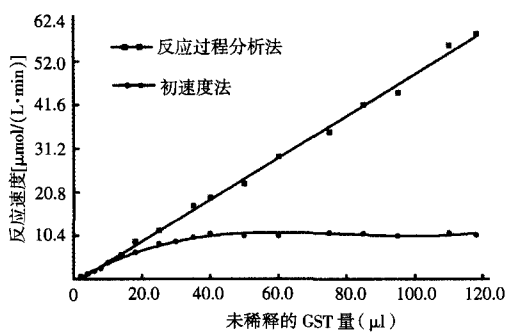


图 2 2 种方法测定酶活性及联用策略的响应曲线

2.4 联用策略的测量范围

将监测 GST 反应的时间固定为 6.0 min，由 V_m 换算成初速度所用 GSH 浓度固定在 48 μmol/L，初速度法所得 GST 活性的线性响应部分基本是反应过程分析法所得 GST 活性朝低浓度酶方向的延长线。分析初速度法和反应过程分析法所测 GST 活性的线性范围内数据，联用策略的上限为分析 GST 反应过程的上限，可测下限接近初速度法的线性下限；但联用策略所得回归估计标准差增加了近 1 倍，使联用策略的理论检测下限高于初速度法可测下限。这可能是联用策略所用 GST 浓度范围太宽，必须多次比例稀释而增加了稀释误差造成的。即使以处于联用策略线性响应范围内的理论检测下限为线性下限，联用策略的上限和下限的比值也超过 50 倍，远宽于任何一种方法单独使用的可测范围。

3 讨 论

需用以反应时间为自变量的积分速度方程分析酶反应过程才能可靠测定参数[12-14]。以反应时间为自变量的 GST 积分速度方程未报道；据文献报道 GST 微分动力学方程可推导

其以反应时间为自变量的积分速度方程如 Eq.(6)。

猪肝碱性GST对CDNB的K_m很低而对GSH的K_m较高[9]，这些动力学特征不同于猪肝酸性 GST 同工酶[15]。GSH稳定性较低，其初始浓度宜作为参数。为获得足够数据用于分析，所用 GSH 浓度不能太低。固定 CDNB 为高浓度而所用GSH约为 K_m 的 25%，以便考察有产物抑制且底物浓度远低于 K_m 时联用策略测定酶活性的有效性；所用 CDNB 浓度高于其K_m的 15 倍且达到 GSH 的 20 倍，故其浓度波动 5%也不会对测定 V_m 造成显著影响，因此可用 Eq.(6)近似测定 V_m。

联用策略测定酶活性的特征在于据所记录酶反应曲线中底物消耗情况选择所需数据分析方法。相同反应条件下，两种方法联用处理不同样品对应不同底物消耗比例的酶反应曲线时，要求 2 种方法定量指标的物理意义完全相同、线性响应的斜率和截距一致、可测量酶活性有交叉区域且交叉区域内结果一致。初速度和反应过程分析法所得 V_m 的意义不同。可用 Eq.(1)将分析酶反应动力学过程所得 V_m 换算成初速度，使得两种方法的定量指标物理意义相同。需优化将 V_m 换算成初速度所用 GSH 浓度和 K_{iq} 等参数，才能使两种方法所得酶活性的线性响应的斜率和截距一致；优化反应体系的初始 GSH 浓度及反应时间可保障两种方法可测酶活性有交叉区域且交叉区域内结果一致[4]。

分析 GST 反应过程测定 V_m 要求最低底物消耗比例超过 50%。在测定酶活性时常固定记录总时间；低酶活性时需较长记录时间，底物消耗才能达到 50%以上；达到 50%底物消耗比例所用时间越长，对应的酶活性就越低，越有利于提供酶反应过程分析法和初速度法都可测定的酶活性交叉区域。但所用记录时间太长会降低分析效率，这是单用反应过程分析法测定酶活性的最大缺点；拓宽可测范围且提高分析效率是联用策略测定酶活性的主要优点之一。因此，需优化实现两种方法联用所需 GST 反应的最短记录时间。

分析实验数据表明设定记录 50 μmol/L GSH 下 GST 反应时间为 6.0 min 可保障 2 种方法测量 GST 活性有交叉区域。优化产物抑制常数 K_{iq} 为 4.0 μmol/L 并用 48 μmol/L GSH 计算反应过程分析法所得初速度，可使得交叉区域内两种方法都可测定的酶活性保持一致，并且 2 种方法所得初速度对酶量响应曲线斜率和截距也无显著差异，从而可实现两种方法联用测量存在强烈产物抑制的 GST 活性，且线性范围比相同条件下单用初速度法或反应过程分析法都更宽。

此联用策略相对于单独用初速度法或反应过程分析法的另一个优势在于当底物浓度低于 K_m 时也能显著拓宽酶活性测量范围[7]。本文用 GST 作为模型，证实存在产物抑制时联用策略在所用底物浓度远低于 K_m 时仍有效和且优势明显。综合已报道结果[4-8]，优化参数用以反应时间为自变量的积分速度方程分析不可逆酶反应过程可测定 V_m；优化监测酶反应过程的时间、初始底物浓度和 V_m 换算成初速度所用底物浓度设置可实现 2 种方法联用，在较低底物浓度下保障单次分析的效率足够高而显著拓宽可测酶活性范围。这种联用策略有望用于测定血清酶和免疫分析的标记酶活性；只要反应曲线可连续记录，此联用策略有望发展成为测定催化不可逆反应酶活性的一类通用新方法。

参 考 文 献

[1] Duggleby R G.Estimation of the initial velocity of enzyme-catalysed reactions by non-linear regression analysis of progress curves[J].Biochem J,1985,228(1):55-60.

[2] Dagys R,Pauliukonis A,Kazlauskas D,et al.Determination of initial velocities of enzymic reactions from progress curves[J].Biochem J,1986,237(3):821-825.

[3] Lu W P,Fei L.A logarithmic approximation to initial rates of enzyme reactions[J].Anal Biochem,2003,316 (1):58-65.

[4] Liu B Z,Zhao Y S,Zhao L N,et al.An integration strategy to estimate the initial rates of enzyme reactions with much expanded linear ranges using uricases as models[J].Anal Chim Acta,2009,631(1):22-28.

[5] Liao F,Yang D Y,Tang J Q,et al.The measurement of serum cholinesterase activities by an integration strategy with expanded linear ranges and negligible substrate-activation[J].Clin Biochem,2009,42(6):926-928.

[6] Yang D Y,Tang J Q,Yang X L,et al.An integration strategy to measure enzyme activities for detecting irreversible inhibitors with dimethoate on butyrylcholinesterase as model[J].Intern J Environ Anal Chem,2011,91(5):431-439.

[7] Li Z R,Liu Y,Yang X L,et al.Kinetic analysis of gamma-glutamyltransferase reaction process for measuring activity via an integration strategy at low concentrations of gamma-glutamyl p-nitroaniline[J].J Zhejiang Univ Sci B,2011,12(3):180-188.

[8] Yang X,Liu B,Sang Y,et al.Kinetic analysis of lactate-dehydrogenase-coupled reaction process and measurement of alanine transaminase by an integration strategy[J].Anal Sci,2010,26(11):1193-1198.

[9] 赵利娜，陶 佳，赵运胜，等.分析谷胱甘肽-S-转硫酶的产物抑制反应过程测定还原型谷胱甘肽[J].西安交通大学学报(医学版)，2006,27(3):300-303.

[10] Habig W H,Pabst M J,Jakoby W B.Glutathione S-transferases.The first enzumaticstep in mercapturic acid formation[J].J Biol Chem,1974,249(22):7130-7139.

[11] Pabst M J,Habig W H,Jakoby W B.Glutathione-S- transferase A.A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration[J].J Biol Chem,1974,249(22):7140-7147.

[12] Orsi B A,Tipton K F.Kinetic analysis of progress curves[J].Methods Enzymol,1979,63:159-183.

[13] Liao F,Tian K C,Yang X,et al.Kinetic substrate quantification by fitting to the integrated Michaelis-Menten equation[J].Anal Bioanal Chem,2003,376(6):756-762.

[14] Liao F,Zhu X Y,Wang Y M,et al.The comparison on the estimation of kinetic parameters by fitting enzyme reaction curve to the integrated rate equation of different predictor variables[J].J Biochem Biophys Methods,2005,62(1):13-24.

[15] 张 灵，杨晓兰，白 婧，等.测定猪肝谷胱甘肽-S-转移酶动力学参数的改变表征其抑制剂[J].重庆医科大学学报，2011,36(10):1218-1221.

（责任编辑：关蕴良）