维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2006)05-0688-06

# 枸杞多糖对酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素 P4502E1 基因及蛋白表达的影响

古 赛[1],王丕龙[1],姜 蓉[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院消化内科;2.重庆医科大学组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过观察枸杞多糖(LBP)对酒精性脂肪肝(AFL)大鼠肝细胞色素 P4502E1 基因和蛋白的影响,揭示其治疗机制。方法:用乙醇灌胃 10 周造成大鼠慢性 AFL 模型,再用 5%、10%LBP 和 10%阿托莫兰(GSH)治疗 10 周,戒酒组为阳性对照,作治疗前后比较:肝脏病理形态,肝匀浆还原型谷光甘肽 GSH、丙二醛 MDA 含量,肝细胞色素 P4502E1(CYP2E1)基因及蛋白表达水平。结果:LBP 能明显改善酒精所致大鼠肝脏脂肪性病理变化,增加 GSH 含量,减少 MDA 产生,抑制 CYP2E1 基因及蛋白表达水平,与阿托莫兰组无显著差异,优于单纯戒酒组。结论:LBP 抑制 CYP2E1 基因及蛋白表达,减轻脂质过氧化作用,有效的治疗 AFL。

【关键词】酒精性脂肪肝;枸杞多糖;治疗;细胞色素 P4502E1

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-26

# Effects of lycium barbarum polysaccharide on the expression of hepatocyte cytochrome P4502E1 in rats with alcoholic fatty liver

*GU Sai, et al*

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:*To study the effect of Lycium Barbarum Polysaccharide (LBP)on the expression of hepatocyte cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in rat model of alcoholic fatty liver (AFL).*Methods:* The AFL rats models were established by ethanol intragastric infusion in ten weeks, then, 5% and 10% LBP and 10% GSH intragastric infusions were adopted to treat those AFL model rats. Liver pathologic changes were observed and CYP2E1 gene and protein expressions as well as the contents of malondialdehyde(MDA) and glutathione(GSH) in liver were detected and compared with those in the control group, treatment groups and abstinence treatment group. *Results:* Fatty degeneration in liver recovered normally in the LBP-treated groups. LBP could inhibit the expressions of CYP2E1 gene and protein, reduce the content of MDA, and increase the content of GSH. The curative effect of LBP was of no significant difference compared with GSH, but had more effect than abstinence treatment. *Conclusion:* LBP can prevent AFL though inhibiting the hepatocyte CYP2E1 expression markedly.

【[key words】Alcoholic fatty liver;Lyceum Barbarum Polysaccharide;Treatment;Cytochrome P450

酒精性肝病随酒精消耗量增加,发病率越来越高,酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver,AFL)是其早期阶段,为防止 AFL 发展为酒精性肝硬化,对其进行有效的治疗显得尤为重要。枸杞多糖(Lycium Barbarum Polysaccharide,LBP)是宁夏枸杞的重要抗氧化成分[1]。本实验研究 LBP 对酒精性脂肪肝大鼠细胞色素 P4502E1(CytochromeP4502E1,CYP2E1)基因及蛋白表达的影响,以期揭示 LBP 的治疗机制。

作者介绍:古 赛(1967- ),女,副教授,博士,主要研究方向:酒精性肝病。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级雄性 Wistar 大鼠 202 只,周龄 7 周,质量 180~220g,购于第三军医大学实验动物中心。无水乙醇,为国产分析醇,LBP 由宁夏中药厂馈赠,配成 5%、10%水溶液待用,还原型谷胱甘肽 GSH(商品名:阿托莫兰)由重庆药友制药有限公司馈赠,配成 10%水溶液待用。MDA、GSH 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 AFL 大鼠模型建立及给药 202 只清洁级大鼠随机分为 2 组,正常对照组 32 只,酒精模型组 170 只,分笼饲养,每笼 5~6 只,全价颗粒饲料喂养(脂肪含量 <5%)。模型组给予

维普资讯 http://www.cqvip.com



40%（V/V）乙醇 8g/kg.d，分 2 次灌胃，间隔时间 9~10 h，至 5 周末，处死 12 只，自 6 周始乙醇浓度增至 50%（V/V）9g/kg.d，方法同前，至 10 周末，先随机处死 3 只病理证实有肝脏脂肪变，再处死 12 只。另因误吸入气道、感染、胃出血等原因死亡 25 只。模型组余下的 118 只，再随机分为 4 组：5%LBP 组、10%LBP 组、10%GSH 组各 30 只，参照文献报道[2,3]，用 5% LBP、10%LBP 和 10%GSH，0.5ml/100g 大鼠，每日 1 次灌胃。戒酒组 28 只，与正常对照组均用等体积的蒸馏水分 2 次灌胃。各组大鼠干预处理 5 周和 10 周时随机处死，见表 1，均取肝脏，分别标记，-80℃冰箱保存。

1.2.2 病理形态学　取肝左叶同一部位组织，10%甲醛固定，石蜡包埋切片，HE 及苏丹Ⅲ染色，光镜下观察脂肪变程度。冰冻切片 CYP2E1 免疫组织化学染色（兔抗鼠 CYP2E1 多克隆抗体购自美国 Chemicon Internation 公司），按链酶菌抗生物素蛋白—抗氧化酶免疫组织化学染色试剂盒（深圳晶美生物有限公司）步骤操作，DAB 显色。

1.2.3 酶学测定　取肝右叶组织 4℃ 下制备 10%肝匀浆，匀浆蛋白测定用考马斯亮蓝法，MDA、GSH 含量测定按试剂盒步骤进行。

1.2.4 RNA 抽提和逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）　肝脏总 RNA 提取和 RT-PCR 按 Wats 和 Takara 试剂盒操作，PCR 引物序列：CYP2E1：5′ -tttccctcttcccatccttg-3，5′ -attaccctgtttc-cccattcc-3′ ；内对照亲环素（Cyclophilin,CYC）：5′ -cttcga-catcacggctgatgg-3′ 5′ -caggacctgtatgcttcagg-3′ ，美国生物医学中心基因库（Gene Bank）中检索。CYP2E1 和 CYC 的 PCR 循环为：95℃预变性 10min，（95℃60s，58℃55s，72℃60s）× 27 次循环，1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，EB 染色，分子量标准为 DNAmakerDL2000，凝胶图像分析系统对 RT-PCR 产物电泳条带行密度分析，测定目的带及 CYC 条带的 V 值（Volume= 平均吸光密度值 × 条带面积），目的条带表达强度 RV=V 目的带 /CYC。本实验采用 2000Mark。

1.2.5 蛋白印迹（Western Blot）　取肝右叶组织 200mg，按申能博彩组织蛋白提取试剂盒说明书操作，上清进行冷冻干燥 24h，含蛋白酶抑制剂的 PBS60ul 稀释蛋白沉淀，考马斯亮蓝法定量，取 70μg 蛋白，变性，行聚丙酰胺凝胶电泳，转移至硝酸纤维膜，6%脱脂奶粉封闭 1~2h，4℃冰箱过夜，洗涤后膜与兔抗鼠 CYP2E1 抗体（1:200）作用 1h，洗涤后加入二抗（抗兔 HRP-IgG 1:5000）反应 1h，化学发光试剂检测，X 光片显影。

1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，数据经 SAS 系统软件处理，组间比较方差齐同用 $t$ 检验，方差不齐用 StatterWaite $t$ 检验。

## 2　结　果

### 2.1　一般情况

正常对照组大鼠在实验观察中均活跃，毛色光滑，质量持续增长，无死亡。酒模组大鼠则反应迟钝，毛色晦暗，质量增长缓慢，至 10 周时死亡 25 只，死亡率为 14.70%。治疗及戒酒组毛色逐渐改善，质量增长趋于加快。5%LBP 组、10%LBP 组、10% GSH 组各死亡 1 只、3 只、1 只，戒酒组死亡 9 只，死亡率高达 32.14%。实验中处死及非正常死亡的大鼠情况见表 1

表 1　非正常死亡及处死表

| 时间 | 5w | 10w | 15w | 20w | 死亡 |
|---|---|---|---|---|---|
| 分组 | | 处死（只） | | | （只） |
| 正常组 | 8 | 8 | 8 | 8 | 0 |
| 酒模组 | 12 | 15 | | | 25 |
| 5%LBP 组 | | | 15 | 14 | 1 |
| 10%LBP 组 | | | 15 | 12 | 3 |
| 10%GSH 组 | | | 15 | 14 | 1 |
| 戒酒组 | | | 10 | 9 | 9 |

### 2.2　肝脏病理形态

光镜下，HE 染色，正常对照组见肝细胞以小叶中央静脉为中心呈放射状排列，肝小叶轮廓清晰，少数肝细胞内小空泡变性（图 1）。10 周酒精模型组大部分（13/15）肝组织切片可见中央静脉周围肝细胞排列紊乱，小叶界限不清，肝细胞浆中见大小不等较广泛空泡变性，散在炎性细胞浸润（图 2）。各治疗组及戒酒组 5 周时肝细胞内空泡变性有所减少，且大空泡少见，10 周时仅在腺泡Ⅲ区肝细胞排列稍显紊乱，细胞内空泡进一步减少，接近正常对照组水平（图 3）。

苏丹Ⅲ染色，正常对照组呈红色的脂肪颗粒极少（图 4），酒精组肝细胞内大量呈红色的脂肪滴（图 5），各治疗组 5 周后红色脂肪颗粒减少，10 周后已接近正常对照组，以 5%LBP 治疗 10 周为代表（图 6）。含脂肪滴肝细胞所占面积评分标准如下：0 分：含脂肪滴肝细胞散在、稀少；1 分：含脂肪滴肝细胞 ≤1/4；2 分：含脂肪滴肝细胞 ≤1/2；3 分：含脂肪滴肝细胞 ≤3/4；4 分：肝组织几乎被脂肪滴所代替，其面积 >3/4。正常对照组及酒模组与各治疗组及戒酒组脂肪变程度比较见表 2。

CYP2E1 免疫组织化学染色，正常对照组可见胞浆中染成棕黄色颗粒的 CYP2E1 的表达局限在腺泡 3 区中央静脉周围少数几个肝细胞内，不超过 2~3 个细胞层的厚度（图 7）。5 周酒精组 CYP2E1 的表达在腺泡 3 区明显增强，10 周酒模组 CYP2E1 表达已呈弥散性分布，从腺泡 3 区弥散至 2 区，分

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 2 各组大鼠肝脏病理苏丹Ⅲ染色脂肪变程度积分

| 分组 | 5w（$n$） | 10w（$n$） |
|---|---|---|
| 正常组 | | 0.75 ± 0.3（8） |
| 酒模组 | | 3.47 ± 0.8（15）' |
| 5%LBP 组 | 2.17 ± 0.6（15）$^{\Delta}$ | 1.14 ± 0.5（14）*$^{\bullet}$ |
| 10%LBP 组 | 2.13 ± 0.8（15）$^{\Delta}$ | 1.17 ± 0.4（12）*$^{\bullet}$ |
| 10%GSH 组 | 1.93 ± 0.5（15）$^{\Delta}$ | 1.07 ± 0.3（14）*$^{\bullet}$ |
| 戒酒组 | 2.70 ± 0.6（10）$^{\Delta\bullet}$ | 1.22 ± 0.5（9）*$^{\bullet}$ |

注：酒模组与正常对照组比 'P<0.05，干预 5 周各组与酒模组比 $^{\Delta}$P<0.05，戒酒 5 周组与各治疗组比 $^{\bullet}$P<0.05，干预 10 周各组与干预 5 周各组比 *P<0.05，干预 10 周各组与正常对照组比 *P<0.05

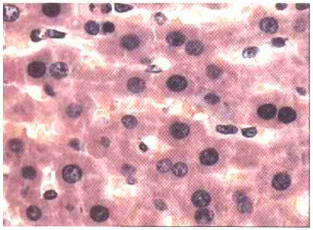


图 1 正常对照组 10 周大鼠肝组织病理切片（HE×400）

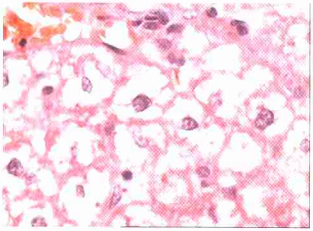


图 2 酒模组 10 周大鼠肝组织病理切片（HE×400）

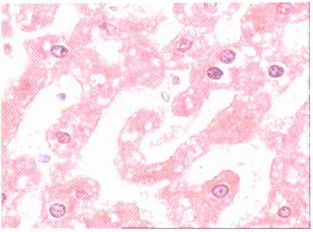


图 3 5%LBP 治疗 10 周大鼠肝组织病理切片（HE×400）

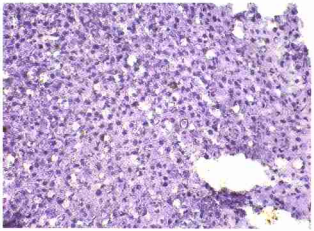


图 4 正常对照组 10 周大鼠肝组织病理切片（苏丹Ⅲ×100）

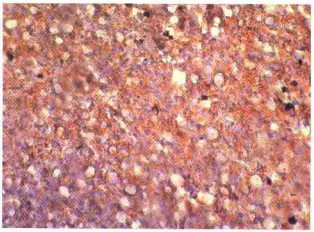


图 5 酒模组 10 周大鼠肝组织病理切片（苏丹Ⅲ×100）

布与脂肪肝的严重程度一致（图 8）。CYP2E1 随干预时间延长而减少，其中 3 个治疗组 CYP2E1 的减少较戒酒组更明显，以 5%LBP 治疗 10 周组为治疗组代表（图 9），戒酒 10 周组（图 10）。

2.3 脂质过氧化酶

10 周各组大鼠脂质过氧化酶测定结果见表 3。

2.4 RT-PCR 检测

对照组、酒模组大鼠各时相与干预处理 5 周、10 周（对应表中 15 周、20 周）各组 CYP2E1/CY-CmRNA 变化见表 4，图 11。

2.5 Western Blot 蛋白印迹法检测各组 CYP2E1 蛋白表达

每组随机抽取 8 份肝标本进行检测，用归一法计算，对照组、酒模组大鼠各时相与干预处理 5 周、

维普资讯 http://www.cqvip.com



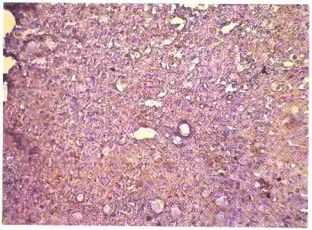


图 6 5%LBP 治疗 10 周大鼠肝组织病理切片(苏丹Ⅲ×100)

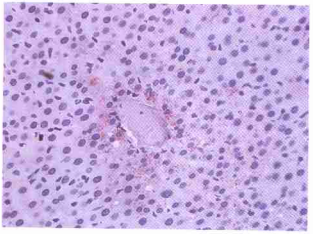


图 7 正常对照组 CYP2E1 免疫组化染色(DAB×200)

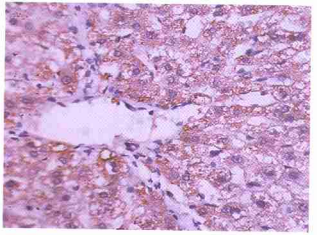


图 8 10 周酒模组 CYP2E1 免疫组组化染色(DAB×200)

10周 (对应表中 15 周、20 周) 数据见表 5, 各组 CYP2E1蛋白表达 X 光片显示图见图 12。

## 3 讨 论

本实验结果显示随乙醇摄入增加,大鼠肝脏脂肪变程度加重,CYP2E1 的表达在腺泡 3 区亦逐渐增强, 并从腺泡 3 区弥散到 2 区,Western Blot 亦显示 CYP2E1 蛋白表达也逐渐增高,RT-PCR 显示 CYP2E1mRNA 表达逐渐增高, 且其增高均与乙醇摄入显示明显量效关系,与脂肪肝病理变化程度相一致。证实了长期慢性乙醇摄入对肝脏的损伤主要是通过微粒体氧化酶系统, 乙醇提高其关键酶 CYP2E1 的基因和蛋白表达,使反应性氧增多,自由基生成增加,进一步促进脂质过氧化反应,终产物 MDA 生成增加,消耗 GSH,生成大量过氧化脂质,抑制抗氧化系的保护作用,使体内氧化 - 抗氧化机制失衡, 并进一步活化 IKKβ 途径引发肝损害[4,5]。本实验还证实了 AFL 大鼠 CYP2E1 蛋白表达增强与其基因表达上调相一致,表明是在转录水平上发挥的作用。

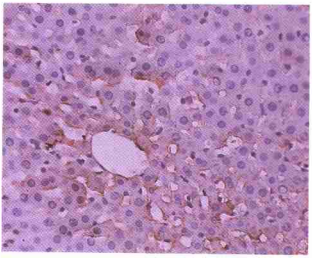


图 9 5%LBP 治疗 10 周 CYP2E1 免疫组化学染色(DAB×200)



图 10 戒酒 10 周 CYP2E1 免疫组织化学染色(DAB×200)

既往实验表明 LBP 能清除氧自由基,抑制脂质

维普资讯 http://www.cqvip.com



表 3 10 周各组大鼠脂质过氧化酶学测定结果

| 分组 | $n$ | GSH（mg/gprot） | MDA（nmol/mgprot） |
|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 8 | 83.15 ± 12.30 | 2.75 ± 0.58 |
| 酒模组 | 15 | 42.48 ± 10.73* | 14.55 ± 3.21* |
| 5%LBP 治疗组 | 14 | 76.08 ± 11.08△ | 3.09 ± 0.3△ |
| 10%LBP 治疗组 | 12 | 75.63 ± 11.07△ | 3.12 ± 0.42△ |
| 10%GSH 治疗组 | 14 | 81.88 ± 13.21△ | 2.89 ± 0.24△ |
| 戒酒组 | 9 | 53.15 ± 10.6△● | 5.53 ± 1.78△● |

注：酒模组与正常对照组比 *$P$<0.05，各干预组与酒模组比 △$P$<0.05，戒酒组与各治疗组比 ●$P$<0.05

过氧化反应[6]。本实验显示 LBP 在体内能有效抑制 CYP2E1 基因和蛋白表达，呈时间依赖性，降低 MDA，提高 GSH，减轻脂质过氧化反应，使肝细胞结构、功能逐渐恢复，脂肪变程度得到有效改善，表明 LBP 在转录水平上有效抑制 CYP2E1 的蛋白表达是其治疗 AFL 的重要机制之一。

还原型谷胱甘肽（GSH）是细胞内一种重要的代谢调节物，具保护细胞、抗氧自由基损伤、促

表 4 各组大鼠 CYP2E1/CYCmRNA（$n$）

| 分组 | 5w | 10w | 15w | 20w |
|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 0.16 ± 0.01（8） | 0.15 ± 0.01（8） | 0.15 ± 0.01（8） | 0.16 ± 0.02(8) |
| 酒模组 | 0.74 ± 0.06（12）* | 1.04 ± 0.07（15）*△ | | |
| 5%LBP 组 | | | 0.55 ± 0.04（15）● | 0.29 ± 0.03（14）●★ |
| 10%LBP 组 | | | 0.52 ± 0.03（15）● | 0.30 ± 0.04（12）●★ |
| 10%GSH 组 | | | 0.50 ± 0.05（15）● | 0.17 ± 0.02（14）●★ |
| 戒酒组 | | | 0.65 ± 0.15（10）●☆ | 0.35 ± 0.06（9）●★☆ |

注：酒模组与正常对照组比 *$P$<0.05，酒模组 10 周与 5 周比 △$P$<0.05，干预组与 10 周酒模组比 ●$P$<0.05，干预 10 周各组与干预 5 周比 ★$P$<0.05，戒酒组与同期各治疗组比 ☆$P$<0.05

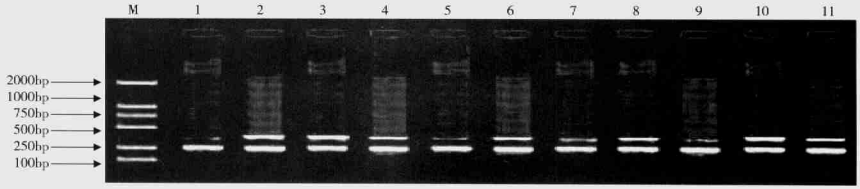



图 11 各组大鼠 CYP2E1 及 CYCmRNA 变化图象

自左向右 1~11 依次为：10 周正常对照组、5 周、10 周酒模组、5 周、10 周 5%LBP 治疗组、5 周、10 周 10%LBP 治疗组、5 周、10 周 10%GSH 治疗组、5 周、10 周戒酒组

表 5 各组 CYP2E1 蛋白表达（$n$=8）

| 分组 | 5w | 10w | 15w | 20w |
|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 0.98 ± 0.11 | 0.99 ± 0.10 | 0.97 ± 0.08 | 0.96 ± 0.10 |
| 酒模组 | 5.53 ± 0.35* | 7.95 ± 0.21*△ | | |
| 5%LBP 组 | | | 4.40 ± 0.36● | 4.40 ± 0.36● |
| 10%LBP 组 | | | 4.32 ± 0.32● | 2.64 ± 0.32●★ |
| 10%GSH 组 | | | 3.91 ± 0.24● | 1.96 ± 0.28●★ |
| 戒酒组 | | | 5.19 ± 0.15●☆ | 3.54 ± 0.38●★☆ |

注：酒模组与同期正常对照组比 *$P$<0.05，酒模组 10 周与 5 周比 △$P$<0.05，干预组与 10 周酒模组比 ●$P$<0.05，干预 10 周各组与干预 5 周比 ★$P$<0.05，戒酒组与同期各治疗组比 ☆$P$<0.05

进肝酶活性和肝解毒功能[7]，大量动物实验和临床均证实 GSH 能有效治疗中毒性肝病[3,8]。本实验以 GSH 作 LBP 的阳性药物对照，发现 LBP 在保护肝脏，恢复肝功能，抗脂质过氧化反应，改善肝脏脂肪变方面与 GSH 无显著性差异。

本研究还表明，虽然 LBP 对 AFL 有一定的治疗作用，有利于脂肪变的早期恢复，但随时间延长，戒酒后肝脏脂肪变的恢复与 LBP 治疗组已较接近，故戒酒仍不失为一种有效且经济的治疗 AFL 方法。

由于时间和经费的限制，本实验仅设 5%和

维普资讯 http://www.cqvip.com



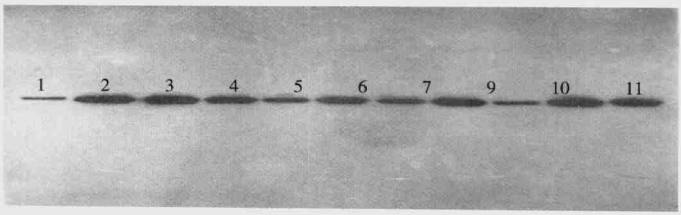



图 12 各组大鼠 CYP2E1 Western Blot 蛋白表达结果

自左向右 1~11 依次为：10 周正常对照组、5 周、10 周酒模组、5 周、10 周 5%LBP 治疗组、5 周、10 周 10%LBP 治疗组、5 周、10 周 10%GSH 治疗组、5 周、10 周戒酒组

10%两种 LBP 剂量，尚未表现出量效关系，而多糖的疗效不一定与剂量呈正比关系，往往有个最适剂量，下一步可多设定几个剂量，以寻求 LBP 的最适剂量，并进一步对 LBP 进行纯化、提取单体，探明分子结构，深入研究。

## 参 考 文 献

[1] 方允中.自由基生命科学进展[M].北京：原子能出版社，1994.101-104.

[2] 沈 泳，杨卫东，任彬彬，等. 宁夏枸杞多糖对 ccl4 损伤的保护作用[J]. 宁夏医学院学报，1996；18（4）：1-2.

[3] 石小枫，刘杞，郭树华. 还原型谷胱甘肽对大鼠肝损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报，2003；28（5）：592-594.

[4] Yang sq,Zhu H,Li Y, et al. Mitochondrial adaptation to obesity related oxidant stress[J]. Arch Biochem Biophys, 2000;378:259-268.

[5] Demeilliers C,Maisonneuve C,Grodet A,et al.Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after Repeated alcohol binges in mice[J].Gastroenterology,2002;123:1278-1290.

[6] 张 熙，谢先春. 枸杞多糖抗氧化作用的实验研究[J]. 中国中药杂志，1993；18（2）：110-112.

[7] 范竹痒，曾民德. 还原型谷胱甘肽治疗肝病的评估[J]. 胃肠病学，1994；4（2）：20-23.

[8] 孙荣玲. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病 134 例[J].临床药学，2005；14（8）：86-87.

（上接第 651 页）

升高[9,10]。表明本文用油酸建立的 Beagle 犬 ARDS 动物模型是顽固性的（中度—重度）。

本文提示，Beagle 犬 ARDS 模型建成功后，通过呼吸机机械通气治疗，动脉血 $PaO_2$ 不易升高，氧合指数（$PaO_2/FiO_2$）≤200。可见，用油酸建立 Beagle 犬 ARDS 模型可行、稳定性好，有望为今后模拟临床，探索 ARDS 新的治疗方法提供实验动物模型。

## 参 考 文 献

[1] Nolan S,Burgess K,Hopper L,et al.Acute respiratory distress syndrome in a community hospital ICU[J].Intensive Care Med.,1997;23(5):530-538.

[2] 中华医学会呼吸病分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J].中华结核和呼吸杂志，2000；23（4）：203.

[3] Wang CZ,Barrow RE,Cox CS Jr,et al.Influence of detergent aerosol on lung microvascular permeability [J].J Appl Physiol,1993;74(3):1016-1023.

[4] Gattinoni L,Pelosi P,Suter PM,et al. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrpulmonary disease:different syndrome[J].Am J Respir Crit Care Med,1998;158:3-11.

[5] 彭传贵，付少才.（Beagle）犬的饲养与繁殖[J].北京实验动物科学与管理，1994；11（4）：22-26.

[6] Kafi SA,Scillia P,Melot C,et al.Abnormal pulmonary vascular tone in canine oleic acid lung injury [J].Crit Care Med,2002;30(70):1565-1569.

[7] 海丽曼·依拉洪，王新英，谢凤莲，等.由酸肺损伤所致 RDS 对心肌超微结构的影响[J].新疆医科大学学报，2000；23（3）：200-201.

[8] 杜永洪，王导新，陈文直，等.油酸所致犬 ARDS 中酸碱平衡及电解质变化的研究[J].中国急救医学，2006；26（3）：193-194.

[9] 蒋幼凡，王导新. 指令频率通气对呼吸衰竭患者呼吸力学的影响及临床意义[J].重庆医科大学学报，2005；30（4）：610-611.

[10] 黄丽洁，解立新，贾 琳，等. 杂种犬急性呼吸窘迫综合征模型的建立[J].中国比较医学杂志，2004；14（4）：224-228.