DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.024
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2235-04

论著

髓样分化蛋白-2在内毒素与内皮细胞结合中的作用

熊建琼,朱佩芳,王正国,蒋建新 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨髓样分化蛋白-2(myeloid differentiation protein-2, MD-2)在人内皮细胞中的表达及其在内毒素(LPS)与内皮细胞结合中的作用。方法 分离、培养人脐静脉内皮细胞,RT-PCR和Western blot方法检测内皮细胞MD-2的表达以及LPS对其表达的影响;流式细胞仪检测在有或无血清时LPS与内皮细胞的结合以及TLR4、MD-2抗体对其结合的影响。结果 内皮细胞有MD-2 mRNA及相关蛋白的表达,LPS能明显上调其表达水平,并呈一定的时间和剂量依赖性;血清能明显促进不同剂量LPS与HUVEC的结合,尤其是小剂量LPS;TLR4、MD-2单克隆抗体分别能阻断LPS与内皮细胞的结合,且阻断程度与抗体剂量呈依赖关系。结论 TLR4、MD-2是内皮细胞上与LPS结合的主要受体,MD-2在LPS与内皮细胞的结合中起着重要的作用。

关键词:髓样分化蛋白-2(MD-2);内毒素类;内皮
中图法分类号:R322.12;R394-33;R996 文献标识码:A

Roles of myeloid differentiation-2 in binding of lipopolysaccharide to human endothelial cells

XIONG Jian-qiong, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of myeloid differentiation protein-2 (MD-2) in the human endothelial cells and its roles in the binding of lipopolysaccharide (LPS) to endothelial cells. Methods Based on cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), the expression of MD-2 and the effects of LPS on the expression were analyzed by RT-PCR and Western blot. The roles of blood serum, TLR4, and MD-2 in LPS binding to endothelial cells were analyzed by flow cytometry. Results MD-2 was expressed in human endothelial cells and LPS could upregulate the expression of MD-2 in time- and dose-dependent manners. Blood serum could obviously promote LPS binding to endothelial cells. Anti-TLR4 and anti-MD-2 monoclonal antibodies significantly inhibited LPS binding to cells in a dose-dependent manner. Conclusion MD-2 may play an important role in the binding of LPS to endothelial cells.

Key words: myeloid differentiation protein-2; endotoxin; endothelium

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)对内皮细胞的损伤在脓毒性休克的发生发展中具有重要的作用,而内皮细胞与LPS的结合是LPS诱导细胞反应的起始步骤。目前认为,LPS与细胞反应至少需要3种分子的参与,即CD14、Toll样受体4(TLR4)和髓样分化蛋白-2(MD-2)。血管内皮细胞表面无CD14表达,LPS必须先与血液循环中的sCD14结合,才能被传递给血管内皮细胞表面的TLR4,TLR4是LPS激活内皮细胞的关键分子,但是,人血管内皮细胞是否能表达MD-2,如果表达,其在LPS与内皮细胞的结合中起着怎样的作用?目前尚少见相关报道,本实验对上述问题进行初步探讨,为进一步研究LPS对内皮细胞的损伤机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和检测仪器

荧光标记LPS(FITC-LPS)、M199培养基、胰蛋白酶购自Sigma公司;抗Ⅷ因子相关抗原的抗体购自北京中山试剂公司;RNA提取试剂盒购自Promega公司,细胞蛋白裂解液(RIPA)、RT-PCR试剂盒均购自上海申能博彩生物工程公司;小鼠抗人MD-2单克隆抗体购自Biocarta公司。流式细胞仪为Becton Dickinson公司产品。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203)
作者简介:熊建琼(1970-),女,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事内毒素的跨膜信号转导机制方面的研究。电话:(023)68754107
通信作者:朱佩芳,电话:(023)68757864
收稿日期:2004-07-15;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 脐静脉内皮细胞(HUVEC)原代培养

将足月顺产或剖腹产新生儿脐带静脉，用生理盐水冲洗至肉眼观察无色为止，然后注入 2.5 g/L 胰蛋白酶溶液，置 37 ℃水浴 15 min，收集脐静脉内消化液，再用含 10% 胎牛血清的 M199 培养基灌洗。离心后弃上清，加入含 10% 胎牛血清 M199 培养基吹打成细胞悬液，计数后接种于培养瓶中，24 h 后换液，以后每 2~3 d 换液 1 次。相差显微镜下观察细胞呈梭形及多角形，融合成单层，呈铺路石样外观，无重叠生长。免疫细胞化学染色Ⅷ因子相关抗原呈阳性，胞浆内可见棕黄色颗粒。

1.3 LPS 刺激前后 HUVEC MD-2 mRNA 表达的检测

用终浓度为 100 μg/L 的 LPS（*E. coli* 026: B6 DIFCO）刺激 HUVEC 0、1、3、6、9 h 及终浓度分别为 10、100、1 000 μg/L 的 LPS 刺激 HUVEC 3 h，按 RNA 提取试剂盒说明书在无 RNA 酶的环境下提取细胞总 RNA，RT-PCR 检测 MD-2 mRNA 的表达。取 1 μg RNA 样品，用逆转录酶和 Oligo(dT)按试剂盒说明书进行 cDNA 合成，取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 扩增，反应体系用 GAPDH 作参照。PCR 引物的序列分别如下：MD-2：（正义链：5′-TTGGGTCTGCAACTCATC-3′；反义链：5′-TCAGATCCTCGGCAAATA-3′）；GAPDH：（正义链：5′-ACCACAGTCCATGCCATCA C-3′；反义链：5′-TCCACCACCGATTGCTGTA-3′）。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳后观察，用 Bio-Rad 2000 图像分析系统进行扫描分析。

1.4 LPS 刺激前后 HUVEC MD-2 表达的检测

用终浓度为 100 μg/L 的 LPS（*E. coli* 026: B6 DIFCO）刺激 HUVEC 0、1、3、6、9 h 及终浓度分别为 10、100、1 000 μg/L 的 LPS 刺激 HUVEC 6 h，按 RIPA 说明书提取细胞总蛋白，Western blot 检测 MD-2。按常规方法进行，一抗为小鼠抗人 MD-2 单克隆抗体，稀释度为 1∶200，二抗为山羊抗小鼠抗体，采用 1∶2 000 稀释度，最后用增强型化学发光检测试剂盒显影，用 Bio-Rad 2000 成像系统进行分析处理，结果以目的条带的平均灰度值（*OD* u/mm²）。

1.5 LPS 与 HUVEC 结合的检测

用胰蛋白酶消化细胞，收集细胞于 EP 管内，分别加入：①无血清培养基 1ml + FITC-LPS 10、100、1 000 μg/L；②5% 小牛血清培养基 1ml + FITC-LPS 10、100、1 000 μg/L；③无血清培养基 1 ml + MD-2 单克隆抗体 0.5、1.0、2.0 μg 37 ℃孵育 30 min，+ FITC-LPS 1 000 μg/L；④无血清培养基 1 ml + TLR4 单克隆抗体 0.5、1.0、2.0 μg 37 ℃孵育 30 min，+ FITC-LPS 1 000 μg/L 以上各组细胞分别 37 ℃孵育 30 min，以 PBS 洗涤细胞 2 次，以未加 FITC-LPS 孵育的 HUVEC 作为阴性对照，上流式细胞仪检测细胞与 FITC-LPS 的结合率。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 内皮细胞 MD-2 mRNA 的表达及 LPS 对其的影响

用半定量 RT-PCR 的方法，检测了 HUVEC MD-2 mRNA 的表达，并观察了 LPS 对其表达的影响。结果表明：内皮细胞本身能明显表达 MD-2 mRNA，用 100 μg/L LPS 刺激后 1 h，MD-2 mRNA 表达即有明显增强，于 3 h 达高峰，随后表达逐渐下降；应用不同浓度的 LPS 刺激细胞 3 h，MD-2mRNA 表达的增强与 LPS 浓度呈一定的剂量依赖性，说明 LPS 能上调 MD-2 mRNA 的表达（表 1）。

表 1 LPS 对内皮细胞 MD-2 mRNA 表达的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

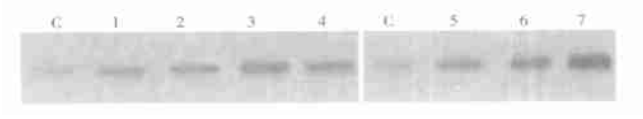
Tab 1 Effects of LPS on the expression of MD-2 in HUVECs by RT-PCR（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Group	*OD* (u/mm²)
Control	0.22±0.02
100 μg/L LPS，1 h	0.37±0.03 *
100 μg/L LPS，3 h	0.49±0.04 *△
100 μg/L LPS，6 h	0.36±0.01 *
100 μg/L LPS，9 h	0.11±0.01 *
10 μg/L LPS，3 h	0.38±0.03 *
100 μg/L LPS，3 h	0.52±0.02 *#
1 000 μg/L LPS，3 h	0.73±0.04 *#

*：$P<0.01$，*vs* control；△：$P<0.01$，*vs* 100 μg/L LPS，1 h group；#：$P<0.01$，*vs* 10 μg/L LPS，3 h group

2.2 内皮细胞 MD-2 的表达及 LPS 对其的影响

用 Western blot 技术检测了脐静脉内皮细胞 MD-2 的表达，并观察了 LPS 对其表达的影响。结果显示与 MD-2 mRNA 的表达情况相似：内皮细胞本身能明显表达 MD-2，用 LPS 刺激后表达增强，于 6 h 达峰值；应用不同浓度的 LPS 刺激细胞后，MD-2 表达的增强与 LPS 浓度呈一定的剂量依赖性，说明 LPS 也能上调 MD-2 的表达（图 1）。



C：Control；1：100 μg/L LPS，1 h；2：100 μg/L LPS，3 h；3：100 μg/L LPS，6 h；4：100 μg/L LPS，9 h；5：10 μg/L LPS，6 h；6：100 μg/L LPS，6 h；7：1 000 μg/L LPS，6 h

图 1 LPS 对内皮细胞 MD-2 表达的影响

Fig 1 Effects of LPS on the expression of MD-2 in HUVECs by Western blot analysis

2.3 LPS 与血管内皮细胞的结合

在无血清存在时，10 μg/L LPS 与 HUVEC 基本无结合，100 μg/L LPS 与 HUVEC 有少量结合，而 1 000 μg/L LPS 与 HUVEC 有较多结合，血清能明显促进不同剂量 LPS 与 HUVEC 的结合，尤其是低浓度 LPS（表 2）。

表 2 不同浓度 LPS 和 HUVEC 共孵育后荧光强度的变化（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of fluorescence intensity of HUVECs after co-culture with different concentrations of FITC-LPS by flow cytometry（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Group	LPS (μg/L)		
	10	100	1 000
Serum-free	0.3±0.078	20.9±2.7△	66.2±3.9△
5% serum	39.8±2.5 *	85.6±3.2 *△	106.3±3.7 *△

*：$P<0.05$，*vs* serum-free；△：$P<0.01$，*vs* 10 μg/L LPS group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　TLR4 抗体对 LPS 与血管内皮细胞结合的影响

无血清时, 1 000 μg/L LPS 与 HUVEC 有较多的结合, TLR4 抗体能显著减少 LPS 与 HUVEC 的结合, 且减少程度与抗体呈剂量依赖性(表 3)。

2.5　MD-2 在 LPS 与血管内皮细胞结合中的作用

在无血清时, 1 000 μg/L LPS 与 HUVEC 有较多的结合, MD-2 抗体能显著减少 LPS 与 HUVEC 的结合, 且减少程度与 MD-2 抗体呈剂量依赖性(表 3)。

表 3　不同剂量 TLR4 抗体、MD-2 抗体对 LPS 和 HUVEC 共孵育后荧光强度的影响 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of TLR4 monoclonal antibody on the binding of FITC-LPS to HUVECs by flow cytometry (n= 3, $\bar{x}\pm s$)

Control	Anti-TLR4 (μg)			Anti-MD-2 (μg)		
	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
65.9±0.26	51.1±0.56 *	36.0±1.87 *	22.6±1.7 *	39.5±1.1 *	25.8±0.23 *	13.0±0.41 *

*: $P<0.01$, *vs* control

3　讨论

进一步深入研究 LPS 与内皮细胞结合的机制, 对阐明 LPS 激活/损伤内皮细胞机制和寻找拮抗靶点有重要意义。由于内皮细胞不表达 mCD14, 其与 LPS 的结合依赖于血清的存在。研究表明, 低浓度 LPS (LPS <100 μg/L)与内皮细胞的结合完全依赖于血清, 高浓度 LPS (LPS≥100 μg/L)与内皮细胞的结合则部分依赖于血清, 而血清能明显促进高浓度 LPS 与内皮细胞的结合[1~3]。本研究用流式细胞仪检测了有或无血清存在时不同剂量 FITC-LPS 与内皮细胞结合的情况, 进一步明确 LPS 是否能直接与内皮细胞结合以及血清在其中的作用。结果显示, 在无血清存在时, 几乎检测不到 10 μg/L LPS 与内皮细胞的结合, 100 μg/L LPS 与内皮细胞有少量结合, 而 1 000 μg/L LPS 与内皮细胞有较多的结合; 5%小牛血清对不同剂量 LPS 与内皮细胞的结合均有明显的促进作用, 特别是对小剂量 LPS 的促进作用更为显著。大量实验表明, 在血清中促进 LPS 与内皮细胞结合的因子是 sCD14 和 LBP。在体外培养的血管内皮细胞, 如牛血管内皮细胞、人脐静脉内皮细胞上清液中, 如仅加入 LPS 而不加血清, LPS 不能与内皮细胞结合, 也不能激活内皮细胞; 加入 LPS 的同时, 加入正常人血清或重组的 sCD14, 能明显促进 LPS 与内皮细胞的结合; 而在加入正常人血清的同时, 加入抗 CD14 单克隆抗体阻断 CD14 的功能, 则能阻断 LPS 与内皮细胞的结合, 表明血清中的 sCD14 是 LPS 结合、激活内皮细胞必不可少的因素或环节。而在加入血清或 sCD14 的同时, 再加入 LBP, 则可增强 LPS 对内皮细胞的结合和激活, 表明血清中的 LBP 在 LPS 与内皮细胞的结合中也是一个重要因子。结合本部分实验结果, 说明血清在小剂量 LPS 与内皮细胞的结合中起着不可缺少的重要作用。而大剂量 LPS 与内皮细胞的结合仅部分依赖于血清, 表现为在无血清时, 高于 100 μg/L 的 LPS 能与内皮细胞结合, 血清仅能对它们的结合起促进作用, 提示内皮细胞膜上存在 LPS 的其它受体成分, 而这种受体在无血清参与的情况下对 LPS 的亲和力较低。由于牛 CD14 与人 CD14 有较高同源性[4], 因此我们用小牛血清进行的实验, 结果说明牛血清同样能促进 LPS 与内皮细胞的结合。

近年来的研究表明, TLR4 是 LPS 的受体分子或信号转导分子, 在介导 LPS 的信号转导中具有重要作用[5,6]。关于内皮细胞上的 LPS 受体, 我们实验室以及 Farure 均研究发现, 内皮细胞表达 TLR4 并且介导 LPS 对内皮细胞的激活/损伤, 是人们长期寻找的内皮细胞上 LPS 作用的受体或跨膜信号转导分子[7,8]。血清中的 sCD14 将其结合的 LPS 传递给内皮细胞上的 TLR4, 由 TLR4 将 LPS 信号传入胞内, 但是关于 LPS 与内皮细胞结合的分子机制还远未阐明。因另有研究表明, TLR4 与 LPS 的亲和力非常低, 即使加入 sCD14, LPS 也不能与 TLR4 结合[9,10], 提示在内皮细胞上可能还存在除 TLR4 外的其它分子参与 LPS 的结合。

MD-2 是一种近年来发现的由 160 个氨基酸组成的分泌型糖蛋白, 它能直接与 LPS 结合, 并通过与 TLR4 胞外区结合而定位于细胞表面, 促进 TLR4 与 LPS 的结合[10~13]。将 LPS/sCD14 与仅转染 TLR4 cDNA 的 HEK293 细胞共同孵育, 在细胞表面检测不到 TLR4 与 LPS 的结合; 而在共转染 TLR4、MD-2cDNA 的 HEK293 细胞, 不但能检测到 LPS 与 MD-2 的结合, 而且亦能检测到 LPS 与 TLR4 的结合; 但是对于共转染 TLR4、MD-2cDNA 的 HEK293 细胞, 如果仅与 LPS 孵育, 而不加入 sCD14, 也只发现极少量的 TLR4 和 MD-2 与 LPS 结合, 说明 TLR4-MD-2 复合物与 LPS 的亲和力仍然较低, 但 sCD14 却能明显促进 LPS 与 TLR4-MD-2 的结合, 而 LPS 一旦与 TLR4-MD-2 结合, 其复合物就相当稳定, 其解离常数比 LPS-CD14 和 LPS-MD-2 的解离常数低 10~20 倍[14]。本实验显示人脐静脉内皮细胞自身能表达 MD-2, 同时, LPS 能明显上调其表达水平, 并呈现一定的时间和剂量依赖关系。结果初步提示: MD-2 在内皮细胞上有表达, 并且可能在 LPS 对内皮细胞激活/损伤效应中可能具有重要作用。但关于 MD-2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在LPS与内皮细胞的结合中到底发挥着怎样的作用尚需进一步阐明。本研究用TLR4、MD-2单克隆抗体与内皮细胞孵育后再加入FITC-LPS，检测LPS与内皮细胞结合的变化，结果显示，在无血清时，1 000 μg/L LPS与内皮细胞有较多结合，而人TLR4、MD-2单克隆抗体分别能阻断LPS与内皮细胞的结合，而且阻断效应与抗体剂量呈现依赖性，表明TLR4、MD-2是内皮细胞上与LPS结合的主要受体，MD-2在LPS与内皮细胞的结合中起着重要的作用。但是，关于MD-2是如何促进TLR4与LPS结合的，还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Hasday R D, Dubin W, Mongovin S, *et al*. Bronchoalveolar macrophage CD14 expression: shift between membrane-associated and soluble pools[J]. Am J Physiol, 1997, 272(5 Pt 1): L925—933.

[2] Read M A, Cordle S R, Veach R A, *et al*. Cell-free pool of CD14 mediates activation of transcription factor NF-kappa B by lipopolysaccharide in human endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(21): 9887—9891.

[3] Yang Z, Breider M A, Carroll R C, *et al*. Soluble CD14 and lipopolysaccharide-binding protein from bovine serum enable bacterial lipopolysaccharide-mediated cytotoxicity and activation of bovine vascular endothelial cells *in vitro*[J]. J Leukoc Biol, 1996, 59(2): 241—271.

[4] Takai N, Kataoka M, Higuchi Y, *et al*. Primary structure of rat CD14 and characteristics of rat CD14, cytokine and NO synthase mRNA expression in mononuclear phagocyte system cells in response to LPS[J]. J Leukoc Biol, 1997, 61(6): 736—744.

[5] Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al*. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science, 1998, 282(5296): 2085—2088.

[6] Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, *et al*. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor4 (Tlr4)[J]. J Exp Med, 1999, 189(4): 615—625.

[7] 杨清武，朱佩芳，王正国，等. Toll样受体4介导内毒素对内皮细胞NF-κB的激活[J]. 生物化学与生物物理进展，2002，29(3)：407—410.

[8] Faure E, Equils O, Sieling P A, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-κB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15): 11058—11063.

[9] Poltorak A, Ricciardi Castagnoli P, Citterio S, *et al*. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(5): 2163—2167.

[10] da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, *et al*. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2[J]. J Biol Chem, 2001, 276(24): 21129—21135.

[11] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, *et al*. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4[J]. J Exp Med, 1999, 189(11): 1777—1782.

[12] Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J A, *et al*. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(21): 12156—12161.

[13] Viriyakosol S, Tobias P S, Kitchens R L, *et al*. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 38044—38051.

[14] Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, *et al*. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14[J]. J Exp Med, 2003, 198(7): 1035—1042.

（编辑 薛国文）

欢迎订阅《中国医学文摘·内科学》

《中国医学文摘·内科学》是由国家科技部批准出版，卫生部主管的国内外公开发行的医学文献检索期刊，为国家级杂志。本刊所收集文献来自公开发行国内医学杂志和学报200余种。收集内容为我国内科领域的新动态、新技术、新方法和新经验。具体栏目包括：传染病和寄生虫病、呼吸系统疾病、循环系统疾病、消化系统疾病、泌尿系统疾病、血液系统疾病、神经系统疾病、精神病、免疫和结缔组织疾病、内分泌和遗传性疾病、营养和代谢疾病、临床药学、中毒及其他等，年终编写“医学主题词索引”和“作者索引”。内容丰富，信息量大，是内科教学、医学科研、内科临床及信息工作者必不可少的参考书和工具书。本刊为16开本，双月刊，每期文摘96页。国际标准号ISSN 1001—4136，国内统一刊号CN45—1121/R，国内邮发代号48—37，每期定价8.50元，全年51.00元（含邮资）。欢迎广大读者积极到当地邮局订阅，亦可直接向本刊编辑部订阅。

1998年起，为了全面、快捷报道我国内科研究信息，我刊在不减少文摘篇幅（96页）的前提下，开辟“内科综述”专栏。几年来，该专栏深受广大读者和作者的欢迎。积极为我刊撰写“内科综述”稿件，不仅为繁荣我国内科事业作出贡献，享有殊荣，而且对作者本人业绩考核、职称评定、科研项目评定等都有极大的帮助。欢迎广大内科同仁为我刊“内科综述”专栏投稿（请寄打印稿与软盘）。

地 址：广西南宁市东葛路20—7号《中国医学文摘·内科学》编辑部 邮 编：530022

电 话：(0771)5887259 传 真：(0771)5869823 E-mail：nkxwz@gxmi.net

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net