DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.013
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
1410 2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)12-1410-04

L-Carnitine拮抗培养心肌细胞缺氧/复氧损伤

朱光旭[1],余争平[1],谢 燕[1],楼淑芬[2],王小华[1],杨明杰[1],杨学森[1],周 舟[2] (第三军医大学预防医学系:[1]军事劳动卫生学教研室;[2]防原医学教研室、全军复合伤研究所;重庆 400038)

提 要:目的 探讨L-Carnitine对心肌细胞缺氧/复氧损伤的防护作用及其可能的机制。方法 以原代培养新生鼠心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型,观察不同剂量L-Carnitine处理后细胞增殖活性、凋亡细胞百分率及DNA断片化率,作为反映L-Carnitine对心肌细胞缺氧/复氧损伤防护作用及其机制的指标。结果 在5~5 000 nmol/L范围内,L-Carnitine预处理对培养心肌细胞缺氧/复氧损伤均显示保护效应;在5、50及500 nmol/L时均显著降低DNA断片化率;L-Carnitine在50 nmol/L时与单纯缺氧/复氧组比较可显著降低凋亡细胞百分率。结论 缺氧/复氧对心肌细胞的影响之一是可诱导心肌细胞凋亡;L-Carnitine对培养心肌细胞培养缺氧/复氧损伤具有防护作用,其机制可能与抑制缺氧/复氧诱导细胞凋亡有关。

关键词:缺氧复氧;细胞凋亡;细胞增殖活性;L-Carnitine
中图法分类号:R364.4 文献标识码:A

L-Carnitine antagonizes hypoxia/reoxygenation-induced damage in cultured myocardial cells of neonatal rats

ZHU Guang-xu, YU Zheng-ping, XIE Yan, LOU Shu-fen, WANG Xiao-hua, YANG Ming-jie, YANG Xue-sen, ZHOU Zhou (Department of Military Labor Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the protective effects and the possible mechanism of L-Carnitine on the primary cultured neonatal rat myocardial cells during hypoxia-reoxygenation(H/R). Methods After myocardial cells were isolated from neonatal rats and cultured under hypoxic situation, they were then cultivated with different doses of L-Carnitine under hypoxia for various times. Cell proliferation, ratios of DNA fragments and percentages of apoptotic cells were determined to indicate the dose-dependent protective effects of L-Carnitine and its possible mechanism. Results The L-Carnitine between 5~5 000 nmol/L exerted significant protective effects on the primary cultured neonatal myocardial cells during H/R; and 5, 50 and 500 nmol/L of L-Carnitine decreased the ratios of DNA fragments markedly compared with control. The addition of 50 nmol/L L-Carnitine also leaded to notable reduction of the percentages of apoptotic cells compared with simple H/R treated group. Conclusion H/R can induce the apoptosis of primary cultured myocardial cells of neonatal rats. L-Carnitine possesses the protective effects on this injury induced by H/R, probably by the mechanism of its suppressing the apoptosis.

Key words: H/R; apoptosis; cell proliferation; L-Carnitine

既往认为心肌细胞坏死是心肌缺血损伤的病理机制。近年来细胞凋亡在心血管系统疾病(如心衰、心梗、心律失常等)发病机制中的作用逐渐被认识。有研究表明凋亡可能是心肌缺血损伤机制的一个重要环节。缺血引起心肌损伤直接的始动因素是缺氧。对于缺氧直接作用于体外培养的心肌细胞而致其凋亡的相关研究仍未见有报道。L-Carnitine亦称L-肉毒碱,广泛分布于体内不同组织细胞,作用是携带长链脂酰CoA通过线粒体内膜,促进三羟酸循环正常进行,协助细胞维持生理活动所需的能量生成[1]。已有研究表明,缺氧/复氧可诱导如血管内皮细胞、神经细胞等发生凋亡和坏死,而缺氧/复氧对细胞有氧呼吸的影响是诱导细胞凋亡和坏死的始因。L-Carnitine在脑缺血过程中对脑能量代谢起显著保护效应,但对缺氧性心肌细胞损伤的保护作用是否与拮抗细胞凋亡有关,仍未见有研究报道。本研究拟通过在细胞水平模拟心肌缺氧损伤,观察不同缺氧时间和缺氧后复氧不同时间体外培养的心肌细胞增殖活性、复氧后不同时相DNA断片化率以及细胞凋亡百分率的变化以探讨L-Carnitine的保护作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

无菌取3~4 d的Wistar大鼠仔鼠心室,剪碎后,经0.125%胰蛋白酶消化,以200目尼龙网过滤分离成单细胞悬液,以含15%胎牛血清的高糖DMEM培养基,在含95%空气:5%CO_2的37 ℃条件下应用差速贴壁法先培养90 min以纯化心肌细胞,然后按实验设计继续培养。

1.2 主要试剂

高糖DMEM培养基(美国Hyclone公司产品)按说明书配制,培养液每升另加青霉素、链霉素使终浓度分别达100 μ/ml、灭活胎牛血清150 ml,调pH值于7.2~7.4。Hoechest 33342(美

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"分题)(G1999054202)
作者简介:朱光旭(1972-),男,贵州省瓮安县人,硕士研究生,医师,主要从事缺氧细胞损伤与防护方面的研究。电话:(023)68752289
收稿日期:2001-03-02;修回日期:2001-05-24

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

国 Sigma 公司产品)临用前用 PBS 配制成 100 μmol/L 的稀释液, 4 ℃保存。L-Carnitine(美国 Sigma 公司产品), 以 DMEM 培养基稀释成 2 mmol/L, 分装、－20 ℃保存。MTT(美国 Sigma 公司产品)以 10 mmol/L PBS(pH 7.4)配成 5 mg/ml, 4 ℃冰箱保存 2 周内备用。其它试剂均为上海生工公司产品。

1.3　主要设备及器材

新生 Wistar 大鼠新生鼠(3 d 龄)购于本校实验动物中心。5% CO_2 培养箱(美国 Queue 2 721 型), 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), HT-7 000plus 多孔读数仪(美国 Perkin Elmen 公司), 荧光显微镜(日本 Olympus 公司), 37 ℃恒温箱(中国天津仪器厂), 紫外分光光度仪(美国 Beckman DU640 型)。

1.4　缺氧模型的建立

将培养心肌细胞置真空干燥罐, 参照王培勇等[2]方法进行, 以含 95% N_2 ∶5% CO_2 气体缺氧, 根据实验设计所需置 37 ℃恒温箱缺氧完毕, 重新置正常 5% CO_2 孵箱继续培养。

1.5　实验分组

研究共分 3 组, 每组实验均重复 3 次。①L-Carnitine 对缺氧不同时间培养的心肌细胞增殖活性影响的量效关系: 在已纯化的心肌细胞接种后 3 d, 于相应时间在 5～5 000 nmol/L 范围内加入不同剂量 L-Carnitine, 分别缺氧 0、4、8、16、32 h, 于复氧 4 h 后检测细胞增殖活性; ②L-Carnitine 对缺氧后复氧不同时间心肌细胞损伤的影响的量效关系: 以相同方法接种细胞, 待细胞贴壁占总培养面积 70%～80% 后, 在缺氧前 2 h 在 5～5 000 nmol/L 范围分别加入不同剂量的以含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基配制 L-Carnitine 稀释液换液, 置正常培养箱内继续培养 2 h, 再缺氧 24 h 后于复氧 0、30、60、120、240 min 检测细胞增殖活性。③L-Carnitine 对缺氧后复氧不同时间心肌细胞培养仔鼠心肌细胞 DNA 断片率及凋亡百分率的影响的量效关系: 以相同方法接种心肌细胞于 75 ml 培养瓶内, 待细胞贴壁生长铺满培养瓶底 70%～80% 后, 在缺氧前 2 h 以含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基配制 0、5、50、500 nmol/L 不同浓度的 L-Carnitine 稀释液换液后, 置正常孵箱内继续培养 2 h, 然后缺氧 24 h, 复氧 0、30、60、120、240 min 分别检测细胞 DNA 断片化率, 同时设置正常及 50 nmol/L L-Carnitine 处理组检测凋亡细胞百分率。

1.6　细胞增殖活性测定

用 MTT 比色法测定细胞增殖活性。将纯化的培养仔鼠心肌细胞以 1× 10^4/well 接种于 96 孔细胞培养板, 置 CO_2 培养箱培养之后进行缺氧模型制备, 以后在正常 CO_2 孵箱培养不同时间, 经不同处理的细胞在加入 MTT 溶液 20 μl 后继续培养 4 h, 弃培养上清, 各孔加入 150 μl 二甲基亚砜(DMSO)、室温振荡 10 min、HT-7000 PMS 多孔读数仪 492 nm 处读取光密度值, 以 DMEM 培养液作空白对照。

1.7　DNA 断片化率检测

以 1× 10^7 细胞经不同处理后在各时相点测定 DNA 断片化率。以小牛胸腺 DNA 作标准曲线、二苯胺比色法[3]检测, 波长为 600 nm。DNA 断片化率(%)＝断片化 DNA/(断片化 DNA＋非断片化 DNA)。

1.8　凋亡细胞百分率检测

取 5× 10^3 细胞, 经细胞固定液(甲醇∶冰乙酸＝3∶1)固定后, Hochest 33342(1 μmol/L)参照文献[3]进行。在荧光显微镜下每个样本中计数 500 个细胞内所含凋亡细胞数, 计算凋亡百分率。

1.9　统计学分析

对不同剂量 L-Carnitine 处理的细胞缺氧/复氧后不同时相细胞增殖活性的变化作双因素方差分析(Two way ANONA), 组内与组间差别作 Student's t 检验。上述统计学分析均用 Minitab 10 统计软件(美国 Minitab Inc 公司)完成。

2　结果

2.1　L-Carnitine 对体外培养心肌细胞缺氧不同时间细胞增殖活性的影响

培养心肌细胞在不同缺氧时间处理后复氧 4 h 检测经不同浓度 L-Carnitine 处理的细胞增殖活性, 发现缺氧对培养心肌细胞增殖活性起明显抑制作用, 且随缺氧时间延长, 细胞增殖活性呈时间依赖性下降。在 5～5 000 nmol/L 范围内, L-Carnitine 对培养心肌细胞缺氧损伤呈显著保护效应, 但是随缺氧时间延长, 其作用趋于减弱, 提示 L-Carnitine 的防护效应强弱与缺氧程度有关, 见表 1。

表 1　**L-Carnitine** 对体外培养心肌细胞缺氧不同时间细胞增殖活性的影响(D_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of L-Carnitine on the proliferation of cultured myocardial cells with 4 h reoxygenation after hypoxia for different times(D_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Dose (nmol/L)	n	Time after hypoxia (h)				
		0	4	8	16	32
Control	9	0.253±0.061	0.250±0.011	0.210±0.086△	0.199±0.011△△	0.167±0.089△△
5	9	0.319±0.031 *	0.290±0.028 *	0.306 ±0.045 *▽	0.267±0.045 *△	0.197 ±0.031△△
50	9	0.335±0.047 **	0.314±0.044 **	0.303 ±0.051 *	0.287 ±0.051 *△	0.220 ±0.031 *△
500	9	0.301±0.033 *	0.277±0.042 *	0.268 ±0.022 *△	0.244 ±0.022 *△△	0.196±0.046△△
5 000	9	0.328±0.041 *	0.274±0.023 *	0.261 ±0.020 *△	0.253 ±0.020 *△△	0.192 ±0.046△△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ vs 0 h

2.2　L-Carnitine 对缺氧后复氧不同时间心肌细胞增殖活性的影响

实验选择 24 h 为缺氧时间, 用同样方法对培养心肌细胞作预处理, 在缺氧后分别观察复氧 0、30、60、120、240 min 细胞增殖活性, 见表 2。结果可见, 在缺氧 24 h 后不同复氧时间, 与单纯缺氧/复氧组比较, L-Carnitine 亦具有显著保护作用。在单纯缺氧/复氧组在复氧 4 h 内, 可见细胞增殖活性逐渐降低, 与 0 h 复氧相比, 在 1 h 之后的细胞增殖活性即有显著差别。

表 2　**L-Carnitine** 对缺氧后复氧不同时间心肌细胞增殖活性的影响(D_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of L-Carnitine on the proliferation of primary cultured myocardial cells with reoxygenation of different times after 24 h hypoxia(D_{490}, $\bar{x}\pm s$)

Dose (nmol/L)	n	Time after reoxygenation (min)				
		0	30	60	120	240
Control	9	0.275±0.086	0.267 ±0.082	0.264 ±0.049	0.242±0.050△	0.226 ±0.049△△
5	9	0.296±0.014 *	0.286 ±0.026 *	0.274 ±0.027	0.259±0.054△	0.273 ±0.037 *
50	9	0.343±0.020 **	0.331 ±0.055 **	0.280 ±0.086 *	0.277±0.037 *△	0.309 ±0.025 **
500	9	0.297±0.017 *	0.291 ±0.024 *	0.273 ±0.033	0.265±0.046△	0.269 ±0.026 *
5 000	9	0.302±0.024 *	0.301 ±0.028 *	0.275 ±0.088	0.245±0.025△	0.255 ±0.042 *△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ vs control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ vs 0 min

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

2.3 L-Carnitine 对缺氧/复氧心肌细胞 DNA 断片化率的影响

实验选定含 0、5、50、500 nmol/L L-Carnitine 浓度的 DMEM 培养基在缺氧前 2 h 对培养心肌细胞进行预处理，分别在缺氧后复氧 0、30、60、120、240 min 检测培养心肌细胞 DNA 断片化率见图 1。L-Carnitine 可抑制缺氧/复氧诱导的 DNA 断片化，且随复氧时间延长，4 h 内单纯缺氧组 DNA 断片化率呈时间依赖性增高，L-Carnitine 处理组 DNA 断片化率增高幅度趋缓，且各处理组不同时相点 DNA 断片化率均明显低于对照组。

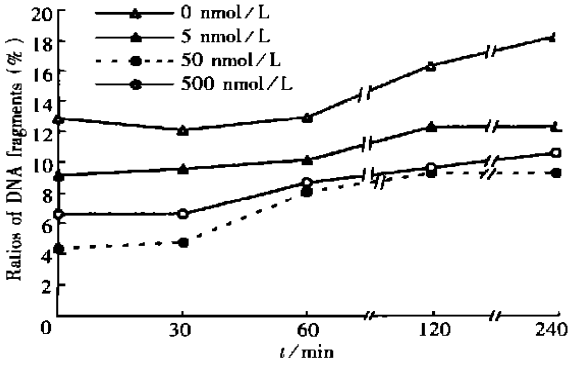


图 1 L-Carnitine 对缺氧/复氧心肌细胞 DNA 断片化率的影响

Fig 1 Effects of L-Carnitine on the ratios of DNA fragments of primary cultured myocardial cells after hypoxia/reoxygenation

2.4 L-Carnitine 对缺氧/复氧心肌细胞凋亡率的影响

为进一步验证 L-Carnitine 对培养仔鼠心肌细胞的缺氧/复氧过程中细胞凋亡的影响，我们以 Hochest33342 作细胞凋亡形态学染色见图 2、3，在荧光显微镜下可观察到核固缩、核碎裂等不同形态的凋亡细胞，而正常细胞核染均匀，核浆界清晰，核染荧光强度明显高于胞质染色。通过计数每个样本 500 个细胞内所含凋亡数计算细胞凋亡百分率见图 4。可见 L-Carnitine 在 50 nmol/L 时，细胞凋亡率显著低于单纯缺氧/复氧组。

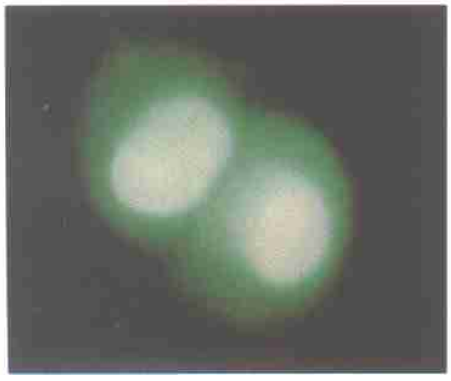


图 2 正常心肌细胞见核染均匀、核浆界清晰 （荧光染色×1 000）

Fig 2 Normal myocardial cells show uniform-stained nuclei and clear karyoplasm （Fluorescence staning× 1 000）

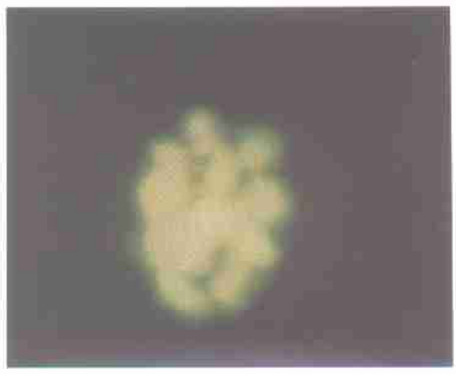
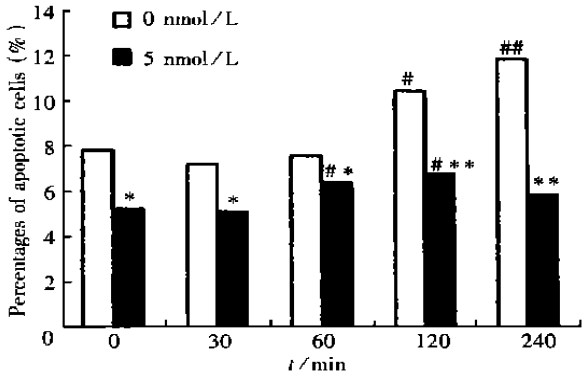


图 3 凋亡细胞呈核碎裂状形态 （荧光染色×1 000）

Fig 3 Apoptotic cells show karyorrhexis （Fluorescence staining× 1 000）



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 0 min

图 4 L-Carnitine 对缺氧/复氧心肌细胞凋亡率的影响

Fig 4 Effects of L-Carnitine on te percentages of apoptotic cells in primary cultured myocardial cells after hypoxia/reoxygenation

3 讨论

心肌细胞供能的主要方式是在有氧条件下的脂肪酸β氧化，而非依赖于糖代谢，这种独特的供能方式决定了心肌细胞对有氧代谢高度依赖和对缺氧性损伤的高度敏感性。L-Carnitine 主要由肝、脾合成，文献报道其具有广泛生物学作用，可调节 CPI-Ⅰ活性，改善脂酸代谢[4]、外源性 L-Carnitine 可防治严重脑缺血损伤，并可促进神经细胞内线粒体活性、减少培养神经细胞核固缩及 DNA 组蛋白向胞浆释放[5]。研究表明，在心梗早期应用 L-Carnitine 可保护缺血造成的微循环障碍，并增强血流恢复能力，防止坏死面积进一步扩大及抑制梗死区域[6]。在大鼠分离的心脏，L-Carnitine 还可调节碳水化合物代谢，服用 L-Carnitine 可增强糖氨化而减少软脂酸盐氧化，保护心肌能量代谢[7]。通过结合β-受体阻断剂、Ca^{2+} 拮抗剂等口服可明显改善心功能不全症状[8]，L-Carnitine 还可提高超氧化物歧化酶活性，协助自由基清除，抑制活性氧导致的器官损伤，

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

在氧化应激中起保护效应[9]。

本研究在培养新生鼠心肌细胞缺氧模型, 从细胞水平探讨了缺氧及缺氧后复氧 L-Carnitine 对心肌细胞的保护效应, 在 5~5 000 nmol/L 范围内, L-Carnitine 均显示了一定保护效应。缺氧不同时间, 尽管其增殖活性在一定时间范围内降低, 但是 L-Carnitine 仍显示一定保护作用, 但同时也观察到缺氧时间越长、保护效应越弱, 因此显示 L-Carnitine 的保护效应与缺氧严重程度有关; 另一方面, 我们同时发现缺氧可严重抑制心肌细胞的生长, L-Carnitine 虽无促心肌细胞增殖作用, 但显著提高已贴壁生长的心肌细胞正常活性。以上结果说明应用 L-Carnitine 预处理, 对于减轻缺氧/复氧对心肌细胞的毒性作用具有重要价值。

L-Carnitine 的防护机理方面, 我们的研究首次证实 L-Carnitine 的缺氧复氧损伤防护作用与抑制缺氧/复氧诱导的细胞凋亡密切相关。直接证据是 L-Carnitine 可显著地降低缺氧复氧诱导的 DNA 断片化率以及细胞凋亡率。文献报道自由基在亚毒剂量时与细胞凋亡发生密切相关。已有研究表明 L-Carnitine 可作为自由基清除剂[9], 但 L-Carnitine 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡是否与清除自由基的作用, 有待进一步研究。

细胞能量代谢改变是缺氧损伤的生化细胞特征之一, 凋亡相关激酶级联反应多为能量依赖性过程, 细胞内能量负荷状态是决定细胞走向凋亡或坏死的重要因素。在 24 h 单纯缺氧后复氧一定时间内, 发现细胞增殖活性呈下降趋势, 而 DNA 断片化率、细胞凋亡率上升趋势, 这可能与复氧后改善细胞能量的作用有关, 因为复氧所致的能量恢复为凋亡相关激酶的激活提供能量保障, 而可能促进细胞凋亡发生。L-Carnitine 处理组的 DNA 断片化率以及凋亡百分率均明显低于单纯缺氧组, 理论上讲, L-Carnitine 预处理显著地保护了细胞的能量负荷状态, 但实验发现并没有显著地促进凋亡的发生, 这一现象提示, L-Carnitine 抑制心肌细胞凋亡可能还存在其他的作用机制, 并且不能排除其作为自由基清除剂所发挥的拮抗凋亡作用。

综上所述, 本研究证实了 L-Carnitine 对缺氧/复氧心肌细胞损伤的保护效应。并且本研究中关于: ① 复氧加重缺氧心肌细胞损伤; ② L-Carnitine 预处理对单纯缺氧以及缺氧后复氧心肌细胞损伤均起保护效应; ③ L-Carnitine 预处理可抑制缺氧/复氧诱导的细胞凋亡等结果和观点, 未见有类似报道。

参考文献:

[1] Zhengping Y U, Yoshihisa I, Masato M, *et al*. Suppression of pentylenetetrazol-induced seizures by carnitine in mice[J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 1997, 355(2): 545—549.

[2] 王培勇, 许蜀敏, 刘　健. 一种简易实用的缺氧培养细胞装置[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(2): S88—89.

[3] 大山ハルミ, 王　冰. アポトシス检出法(日文)[M]. 东京: 医学书院, 1999.80—95.

[4] Heo K, Lin X, Odle J, *et al*. Kinetics of carnitine palmitoytransferase-I are altered by dietary variables and suggest a metabolic beed for supplemented carnitine in young pigs[J]. J Nutr, 2000, 130(10): 2 467—2 470.

[5] Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, *et al*. Anti-apoptosis effect of acetyl-l-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons[J]. J Pharmacol, 2000, 83(2): 119—124.

[6] Colonnon P, Iliceto S. Myocardial infarction and left ventricular remodeling: result of the CEDIM trial Carnitine Ecocardiogratia Digtalizzata Infarto Miocardico[J]. Am Heart J, 2000, 139(2pt3): s124—s130.

[7] Lopaschuk G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion[J]. Am Heart J, 2000, 139(2pt3): s116—s119.

[8] Loster H, Miene K, Punzel M, *et al*. Prolonged oral L-carnitine substitution increase bicycle trgometer performance in patients with serve ischemically induced cardic insufficiency[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1999, 13(6): 537—546.

[9] Gurlek A, Tutar E, Akcil E, *et al*. The effects of L-carnitine treatment on left ventricular function and erythrocyte superoxide dismutase activity in patient with ischemic cardiomyopathy[J]. Eur J Heart Fail, 2000, 2(2): 189—193.

(编辑　冷怀明)

(上接 1409 页)

警用水渗湿就可加强防护这个基本知识, 至使 2 名干警成为中毒程度最深的人(因在染毒区时间最长)。提示利用一切宣传媒体开展全民有毒化学物防护知识教育已显十分重要。

2.2　加强全民国防建设

氯气虽已退出化学武器范畴, 但类似窒息性化学武器当今世界越来越多。德军医学专家 Ursich Helm 指出"只要还在生产和储存用于战争的化学毒剂, 就存在武装冲突中使用化学毒剂的危险"[3]。

和平时期就做好未来防化学战争的准备工作, 是各国目前重点研究的课题。此次氯气泄漏伤员抢救不足: 提示我们, 在抓紧国防知识教育的同时, 在各地预备役部队中筹建防化分队, 当地一但有化学中毒事件就由他们来处理, 笔者认为是可行的。预备役防化分队由当地的"120"急救系统人员组成, 效果会更好, 这样既利于平时抢险又利于未来战争卫生保障。

2.3　专业分队人员配备防化侦、检、防装备

此次氯气泄漏的报警、预防、伤员现场抢救, 以及对毒源的消除应说都不很理想, 这与平时相应卫生装备不落实密切相关。主要是: ①抢险人员缺少化学毒气侦毒设备。②"110、119、120"机动急救力量平时都未装备防毒抢救用品。此次事故一发生, 各单位均临时寻找防毒用具, 是这次延误抢救时间的主因。笔者认为各地的应急救治力量均应装备侦毒防毒用品(如多功能侦毒箱、防毒急救药品、防毒面具、防毒衣、防毒工具箱等), 这已是当务之急的工作。

关键词: 氯气中毒; 流行病学现场调查
中图法分类号: R595.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 桑中林. 核化生武器使用的影响及防护[M]. 北京: 解放军出版社, 1992.83—89.

[2] 程天民. 军事预防医学概论[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999.68—85.

[3] [德] E 列本蒂施. 军事医学若干问题[M]. 北京: 解放军出版社, 1984.324—325.

(编辑　薛国文)

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