

四逆汤对复苏后综合征脑保护作用的实验研究

王秀娟 钟晓芄 丁钊 张诗武

300121 天津, 天津市人民医院急诊科

通讯作者: 王秀娟, Email: wxj_lele@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.04.006

【摘要】 目的 探讨四逆汤对大鼠心肺复苏(CPR)后综合征的脑保护作用及其机制。方法 将 50 只 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组($n=10$)、CPR 模型组($n=20$)和四逆汤治疗组($n=20$)。采用气管夹闭法复制大鼠心搏骤停模型,心脏停跳 5 min 后行 CPR。四逆汤治疗组以 5 g/kg 的四逆汤灌胃治疗,每 24 h 给药 1 次,假手术组和 CPR 模型组给予等量生理盐水灌胃。于复苏前和复苏后 6、12、24、48、72 h 取大鼠静脉血,用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;于复苏后 72 h 取各组大鼠脑皮质,用免疫组化法检测脑组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)含量,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定大鼠脑组织 caspase-3 蛋白表达,用原位末端缺刻标记试验(TUNEL)测定脑组织细胞凋亡情况。结果 随时间延长,CPR 模型组和四逆汤组 IL-6、TNF- α 水平均呈先升高后降低的趋势,IL-6 于复苏后 24 h 达峰值,TNF- α 于复苏后 48 h 达峰值,复苏后 72 h 均降低;自复苏后 6 h 开始,CPR 模型组和四逆汤治疗组血清 IL-6 (ng/L: 61.79 ± 1.31 、 62.49 ± 1.42 比 21.48 ± 0.79)、TNF- α (ng/L: 48.32 ± 1.98 、 25.32 ± 1.96 比 18.34 ± 2.45) 水平即显著高于假手术组,四逆汤治疗组 IL-6 于复苏后 12 h 起 (ng/L: 70.41 ± 2.21 比 88.32 ± 1.59)、TNF- α 于复苏后 6 h 起 (ng/L: 25.32 ± 1.96 比 48.32 ± 1.98) 明显低于 CPR 模型组(均 $P < 0.05$),持续到复苏后 72 h,两组 IL-6、TNF- α 在结束时均未恢复到正常水平(均 $P < 0.05$)。复苏结束后,CPR 模型组脑组织 caspase-3 含量和蛋白表达以及细胞凋亡率均明显高于假手术组 [caspase-3 含量(A 值, $\times 10^3$): 2.59 ± 0.26 比 1.57 ± 0.06 , caspase-3 蛋白(灰度值): 0.80 ± 0.08 比 0.43 ± 0.04 , 细胞凋亡率: $(2.01 \pm 0.08)\%$ 比 $(0.26 \pm 0.02)\%$, 均 $P < 0.05$], 四逆汤治疗组上述指标均显著低于 CPR 模型组 [caspase-3 含量(A 值, $\times 10^3$): 1.89 ± 0.08 比 2.59 ± 0.26 , caspase-3 蛋白表达(灰度值): 0.57 ± 0.02 比 0.80 ± 0.08 , 细胞凋亡率: $(1.03 \pm 0.05)\%$ 比 $(2.01 \pm 0.08)\%$, 均 $P < 0.05$]。结论 四逆汤对大鼠复苏后综合征的脑保护作用可能是通过抑制炎症因子及减少细胞凋亡来实现的。

【关键词】 四逆汤; 复苏后综合征; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3

基金项目: 国家自然科学基金(81672426)

An experimental study on brain protective effect of Sini decoction on post-resuscitation syndrome

Wang Xiujuan, Zhong Xiaopeng, Ding Bo, Zhang Shiwu

Department of Emergency, Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China

Corresponding author: Wang Xiujuan, Email: wxj_lele@163.com

【Abstract】 Objective To approach the brain protective effect and mechanism of Sini decoction on rats with cardiopulmonary resuscitation (CPR) syndrome. **Methods** Fifty Sprague-Dawley (SD) rats were divided into sham operation group ($n = 10$), CPR model group ($n = 20$) and Sini decoction treatment group ($n = 20$) by random number table. The rat models were established by trachea clipping to induce cardiac arrest, and after heart beat stopped for 5 minutes, CPR was carried out. In the Sini decoction group, Sini decoction 5 g/kg was given through a stomach tube, once per 24 hours, while in the sham and CPR model groups, the same amount of normal saline was given by the same method at the same time. Venous blood was collected before CPR and 6, 12, 24, 48 and 72 hours after CPR, and the levels of serum interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) were determined by enzyme linked immunosorbent test (ELISA); after CPR for 72 hours, the rat brain tissue was obtained from all the groups, the content of caspase-3 in brain tissue was detected by immunohistochemistry method, and its protein expression caspase-3 was detected by Western Blot; the apoptosis situation of brain tissue was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** With the prolongation of time, the levels of IL-6 and TNF- α in CPR model and Sini decoction groups showed a tendency firstly increased and then decreased, IL-6 reached its peak value after resuscitation for 24 hours, while TNF- α reached its peak value after resuscitation for 48 hours, and both IL-6 and TNF- α were decreased after resuscitation for 72 hours; beginning from 6 hours after resuscitation, the levels of serum IL-6 (ng/L: 61.79 ± 1.31 , 62.49 ± 1.42 vs. 21.48 ± 0.79) and TNF- α (ng/L: 48.32 ± 1.98 , 25.32 ± 1.96 vs. 18.34 ± 2.45) in CPR model and Sini decoction treatment groups were all significantly higher than those in sham group, since 12 hours after resuscitation, the level of IL-6 was significantly lower in Sini decoction than that in CPR model group (ng/L: 70.41 ± 2.21 vs. 88.32 ± 1.59), and since 6 hours after resuscitation, TNF- α was obviously lower in Sini decoction group than that in CPR model group (ng/L: 25.32 ± 1.96 vs. 48.32 ± 1.98 , all $P < 0.05$), both IL-6, TNF- α persisting to 72 hours after resuscitation, and their levels did not return to normal at the end of experiment in the two groups. After the end of resuscitation, the content and protein

expression of caspase-3 and rate of cell apoptosis in the brain tissue in CPR model group were significantly higher than those in the sham group [caspase-3 content (A value, $\times 10^3$): 2.59 ± 0.26 vs. 1.57 ± 0.06 , caspase-3 protein (gray value): 0.80 ± 0.08 vs. 0.43 ± 0.04 , apoptosis rate: $(2.01 \pm 0.08)\%$ vs. $(0.26 \pm 0.02)\%$, all $P < 0.05$], above indexes in the Sini decoction treatment group were significantly lower than those in the CPR model group [caspase-3 content (A value, $\times 10^3$): 1.89 ± 0.08 vs. 2.59 ± 0.26 , caspase-3 protein (gray value): 0.57 ± 0.02 vs. 0.80 ± 0.08 , apoptosis rate: $(1.03 \pm 0.05)\%$ vs. $(2.01 \pm 0.08)\%$, all $P < 0.05$]. **Conclusion** The Sini decoction has a protective effect on rats with post-resuscitation syndrome, and its mechanism is possibly realized by the inhibition of inflammatory factors and reduction of cell apoptosis.

【Key words】 Sini decoction; Post-resuscitation syndrome; Interleukin-6; Tumour necrosis factor- α ; Caspase-3

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81672426)

复苏后综合征是心搏骤停患者经人工心肺复苏(CPR)后、虽自主循环恢复(ROSC),但出现一系列特殊病理生理状态的疾病。CPR后,各组织器官血流灌注不足和缺血,引起细胞不同程度功能损害或再灌注损伤,常继发出现心、脑、肺、肝、肾和消化系统等功能障碍甚至衰竭,是CPR患者的主要死亡原因^[1]。临床研究显示,CPR存活出院患者,约有50%存在永久性神经系统损害,而住院患者中60%以上死于复苏后脑损伤,CPR的成败关键在于脑复苏^[2]。目前国内外对复苏后脑功能恢复治疗措施的研究还较少,而中医中药在复苏后综合征中应用的研究日益增加,四逆汤因其在治疗心脑血管疾病中的疗效显著越来越受到关注,对其药理学方面的研究也倍受重视,四逆汤目前多用于复苏后心肌的保护,较少有将其用于脑功能恢复的研究。本研究探讨四逆汤对复苏后综合征大鼠的脑保护作用及其机制,为临床CPR的治疗提供理论基础。

1 材料与方

1.1 实验动物及分组:选择48~62日龄健康SD大鼠50只,雌雄不限,体质量235~368g,由中国科学院放射研究所动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001。将大鼠按随机数字表法分为假手术组($n=10$)、CPR模型组($n=20$)、四逆汤治疗组($n=20$)。四逆汤治疗组进行常规CPR,待ROSC后给予5g/kg四逆汤灌胃治疗〔四逆汤遵循《伤寒论》中原处方规定由熟附子、干姜、炙甘草按5:3:2比例配置,即附片15g、干姜9g、炙甘草6g〕,每日1次,假手术组和CPR模型组灌胃治疗等量生理盐水。

1.2 动物模型制备及处理:大鼠麻醉后固定于手术台上,于右侧股部行约1cm切口,分离股动脉,置入24号套管针连接压力换能器,使用多功能生理监护仪监测有创动脉压和心电图。从颈部行正中切口,分离气管并插入气管导管(14G套管针外套管),于呼气末夹闭气管导管致大鼠心搏骤停,停

跳5min后开始CPR,复苏开始给予机械通气,通气频率80次/min,潮气量6mL/kg,吸入氧浓度(FiO_2)1.00,出现自主心律、脉搏波且收缩压 ≥ 60 mmHg(1mmHg=0.133kPa)持续10min以上判定为ROSC。所有实验参数设计和记录均参照复苏实验研究的Utstein模式。假手术组仅进行气管插管等手术操作,不进行心搏骤停和CPR。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血清炎症因子水平测定:于复苏前和复苏后6、12、24、48、72h取大鼠静脉血,用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,试剂盒均购自美国Ebioscience生物有限公司。

1.3.2 脑组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)测定:复苏后72h处死大鼠,取大鼠脑皮质。

1.3.2.1 含量测定:用免疫组化法测定脑组织caspase-3含量,用Image-Pro Plus 6.0软件分析棕褐色累积吸光度(A)值。

1.3.2.2 蛋白表达测定:用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定脑组织caspase-3蛋白表达水平,结果以 β 肌动蛋白(β -actin)为内参,计算各组caspase-3蛋白相对含量。

1.3.2.3 细胞凋亡情况测定:用原位末端缺刻标记试验(TUNEL)测定脑组织细胞凋亡情况,200倍光镜下,每组切片拍摄5个阳性视野,细胞凋亡率用TUNEL阳性或caspase-3/TUNEL双阳性细胞数/高倍视野下细胞数 $\times 100\%$ 来计算。

1.4 统计学处理:使用SPSS 18.0统计软件处理数据,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠复苏不同时间点血清IL-6、TNF- α

水平比较(表 1): 随时间延长, CPR 模型组和四逆汤治疗组 IL-6、TNF- α 水平均呈先升高后降低的趋势, IL-6 于复苏后 24 h 达峰值, TNF- α 于复苏后 48 h 达峰值, 复苏后 72 h 均降低, 自复苏后 6 h 开始, CPR 模型组和四逆汤治疗组血清 IL-6、TNF- α 水平即显著高于假手术组, IL-6 于复苏后 12 h 起、TNF- α 于复苏后 6 h 起四逆汤治疗组均低于 CPR 模型组(均 $P < 0.05$), 两组在实验结束时 IL-6、TNF- α 均未恢复到正常水平。

表 1 各组大鼠复苏不同时间点血清 IL-6 及 TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
假手术组		10	21.48 \pm 0.79	18.34 \pm 2.45
CPR 模型组	复苏前	20	20.35 \pm 0.67	19.01 \pm 2.09
	复苏后 6 h	20	61.79 \pm 1.31 ^{ab}	48.32 \pm 1.98 ^{ab}
	复苏后 12 h	20	88.32 \pm 1.59 ^{ab}	59.21 \pm 2.45 ^{ab}
	复苏后 24 h	20	92.46 \pm 1.98 ^{ab}	79.38 \pm 2.36 ^{ab}
	复苏后 48 h	20	82.96 \pm 1.83 ^{ab}	92.11 \pm 3.76 ^{ab}
四逆汤治疗组	复苏前	20	21.79 \pm 0.56	18.79 \pm 2.34
	复苏后 6 h	20	62.49 \pm 1.42 ^{ab}	25.32 \pm 1.96 ^{abc}
	复苏后 12 h	20	70.41 \pm 2.21 ^{abc}	42.51 \pm 1.31 ^{abc}
	复苏后 24 h	20	78.32 \pm 1.22 ^{abc}	52.32 \pm 1.78 ^{abc}
	复苏后 48 h	20	63.48 \pm 1.69 ^{abc}	62.16 \pm 2.09 ^{abc}
	复苏后 72 h	20	49.52 \pm 2.05 ^{abc}	48.31 \pm 1.32 ^{abc}

注: 与复苏前比较, ^a $P < 0.05$; 与假手术组比较, ^b $P < 0.05$; 与 CPR 模型组比较, ^c $P < 0.05$

2.2 各组大鼠脑组织 caspase-3 含量比较(表 2): 假手术组和四逆汤治疗组均可见一定量 caspase-3 表达, CPR 模型组可见大量棕褐色 caspase-3 表达。CPR 模型组、四逆汤治疗组 caspase-3 含量较假手术组明显升高, 四逆汤治疗组 caspase-3 含量较 CPR 模型组明显降低(均 $P < 0.05$)。

表 2 各组脑组织 caspase-3 含量、蛋白表达及细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	caspase-3 含量 (A 值, $\times 10^3$)	caspase-3 蛋白表达 (灰度值)	细胞凋亡率 (%)
假手术组	10	1.57 \pm 0.06	0.43 \pm 0.04	0.26 \pm 0.02
CPR 模型组	20	2.59 \pm 0.26 ^a	0.80 \pm 0.08 ^a	2.01 \pm 0.08 ^a
四逆汤治疗组	20	1.89 \pm 0.08 ^{ab}	0.57 \pm 0.02 ^{ab}	1.03 \pm 0.05 ^{ab}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CPR 模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 各组大鼠脑组织 caspase-3 蛋白表达水平比较(表 2; 图 1): CPR 模型组、四逆汤治疗组 caspase-3 蛋白表达均较假手术组明显增加, 四逆汤治疗组 caspase-3 蛋白表达较 CPR 模型组明显减少(均 $P < 0.05$)。

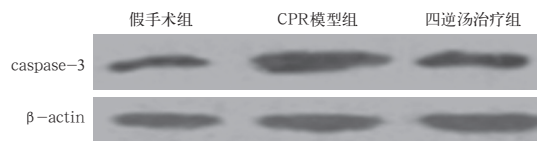


图 1 Western Blot 检测各组大鼠脑组织 caspase-3 蛋白表达

2.4 各组大鼠脑组织细胞凋亡率比较(表 2): CPR 模型组和四逆汤治疗组细胞凋亡率均较假手术组明显升高, 四逆汤治疗组细胞凋亡率较 CPR 模型组明显降低(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

CPR 后机体出现一系列复杂的病理生理状态, 对机体的预后具有重要影响^[3]。复苏后综合征的发病机制目前尚未明确, 主要包括缺血/再灌注(I/R)损伤、炎症反应和细胞凋亡, 其中炎症反应是造成 I/R 损伤的主要原因之一^[4]。复苏后综合征的发生发展与一系列信号转导途径有关, 其中炎症因子起着关键性的作用, 目前研究较多的炎症因子包括巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α)、IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-10 等, 炎症因子主要通过细胞信号转导途径来调控相应基因的表达从而参与炎症反应^[5], 因此抑制炎症反应过程中炎症因子的表达对减轻 CPR 后器官损伤具有重要临床意义。

IL-6 和 TNF- α 是炎症反应中研究较多的炎症因子。TNF- α 主要由活化的单核-巨噬细胞产生, 具有多种生物学活性, 可提高中性粒细胞的吞噬能力, 激活一系列信号转导途径^[6], TNF- α 作为经典的炎症启动因子, 可以刺激 IL-6 等的释放, 在机体应激反应早期发挥着核心作用, 虽然其半衰期较短, 但却能导致炎症因子的“瀑布样”释放, 促进其他炎症介质的分泌, 引起机体代谢及血流动力学的改变。IL-6 作为炎症细胞因子中的主要成员, 可诱导系统性急性期反应物释放, 是调节细胞免疫和体液免疫的核心因子, 在组织受损后 2~4 h 升高, 其升高程度往往与疾病的严重程度密切相关^[7]。本研究显示, 从复苏后 6 h 开始, CPR 模型组和四逆汤治疗组血清 IL-6 水平显著高于假手术组, 随着时间的延长, CPR 模型组和四逆汤治疗组复苏后 24 h 达到峰值, 以后逐渐降低, 两组实验结束后均未恢复到正常水平, CPR 模型组及四逆汤治疗组复苏后 TNF- α 水平逐渐升高, 至 48 h 达峰值后下降, 72 h 仍明显高于假手术组。

目前认为细胞凋亡是 CPR 后神经功能障碍的重要机制之一^[8]。细胞凋亡的途径有 3 种^[9]: 死亡

受体途径、线粒体途径和内质网途径,这 3 条途径中除线粒体途径中的凋亡诱导因子途径外,其他途径都是经过 caspase 家族的激活而实现的。caspase 是一组存在于细胞质中具有相似结构的蛋白酶,与真核细胞的凋亡密切相关,并参与细胞的生长、分化及凋亡调节。Caspase 是一种很普遍的细胞凋亡驱动器,其活化是细胞程序性死亡中细胞蛋白裂解的一个重要环节,caspase 家族蛋白在哺乳动物神经细胞的凋亡过程中起核心作用,从一定程度上反映细胞凋亡的程度。其中起细胞凋亡执行作用的是 caspase-3、6、7。在细胞凋亡进程中,细胞核形态变化与 caspase-3 的表达起着重要提示作用。活化的 caspase-3 是 caspase 家族中引起细胞凋亡的关键酶,能导致 DNA 片段化、凋亡小体形成和神经细胞死亡^[10]。有研究表明,在氧化应激过程中,细胞 caspase-3 表达增多,TUNEL 阳性细胞数量也会相应的增多^[11]。本研究亦显示,CPR 模型组脑组织 caspase-3 表达及细胞凋亡率均明显高于假手术组。

四逆汤是东汉张仲景《伤寒杂病论》中治疗少阴虚寒证的主方,现代药理学研究表明,四逆汤具有调节免疫功能、清除氧自由基、保护内皮细胞、调节血压和改善冠状动脉循环、增加组织灌注及预防休克等的作用^[12],还可显著提高内毒素诱导腹腔巨噬细胞免疫反应实验模型大鼠巨噬细胞的吞噬功能及代谢活性,减少炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放^[13]。本研究显示,四逆汤治疗组血清 TNF- α 、IL-6 水平和脑组织 caspase-3 表达及细胞凋亡率均明显低于 CPR 模型组,四逆汤可能是通过下调 TNF- α 和 IL-6 的表达水平,抑制炎症反应,并通过减少细胞凋亡,起到有效改善 CPR 大鼠脑功能的作用,为中西医结合防治复苏后综合征脑功能恢复提供了实验依据。尽管四逆汤在抗心肌缺血、保护脑缺血后损伤、降血压、抗动脉粥样硬化、免疫调节及抗休克等方面的药理学研究已取得了很大进展,但对于四逆汤的药理学作用及相关机制仍值得进一步的探讨。

参考文献

- [1] Kwon WY, Suh GJ, Kim KS, et al. Niacin suppresses the mitogen-activated protein kinase pathway and attenuates brain injury after cardiac arrest in rats [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41 (9): e223-232. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31828a2394.
- [2] Dell'anna AM, Scolletta S, Donatello K, et al. Early neuroprotection after cardiac arrest [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2014, 20 (3): 250-258. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000086.
- [3] 张东,赵淑杰,李南,等.心搏骤停后综合征预后相关影响因素的分析[J].*中华危重病急救医学*, 2015, 27 (3): 175-179. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.004.

influencing the prognosis of post cardiac arrest syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (3): 175-179. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.004.

- [4] Dannevig I, Solevåg AL, Sonerud T, et al. Brain inflammation induced by severe asphyxia in newborn pigs and the impact of alternative resuscitation strategies on the newborn central nervous system [J]. *Pediatr Res*, 2013, 73 (2): 163-170. DOI: 10.1038/pr.2012.167.
- [5] Wang J, Fujiyoshi T, Kosaka Y, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation induces a neuroprotective phenotype in activated microglia and improves neuronal survival [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33 (10): 1574-1581. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.111.
- [6] 吕杰,杨劲松,李童,等.血必净注射液对脓毒性休克大鼠器官微观结构的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (1): 46-50. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.01.011.
- [7] 赵明亮,杨细平,田竺,等.亚低温联合依达拉奉对重型颅脑创伤患者脑脊液肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-6 表达的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (4): 258-261. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.04.08.
- [8] 薄丰山,王迪芬,刘文悦,等.亚低温预处理对谷氨酸诱导现代大鼠皮层神经细胞损伤的保护作用[J].*中华危重病急救医学*, 2014, 26 (4): 264-268. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.04.013.
- [9] 武彩霞,刘睿,杜冠华.内质网应激与脑缺血/再灌注损伤[J].*中国药理学通报*, 2013, 29 (5): 601-605. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2013.05.003.
- [10] 梁佳,卢峻,崔善福,等.电针对慢性应激抑郁模型大鼠额叶皮质及海马 Caspase-3 基因表达的影响[J].*中华行为医学与脑科学杂志*, 2012, 21 (2): 97-100. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2012.02.001.
- [11] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802 (1): 92-99. DOI: 10.1016/j.bbdis.2009.09.002.
- [12] 冯秋荣,李必坚,杨西晓.四逆汤的现代药理及作用机制研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12 (2): 239-240. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1349.2014.02.056.
- [13] 曾萍,杨镒宇,吴伟康,等.四逆汤对 SIRS 大鼠的早期干预[J].*中国病理生理杂志*, 2009, 25 (6): 1222-1224. DOI: 10.3321/j.issn:1000-4718.2009.06.037.

(收稿日期:2017-04-20)