

# JNK 信号通路在白介素-1 $\beta$ 介导人胚肺成纤维细胞活化中的作用

张 慧 林蓓蓓 张维溪 林 立 李昌崇

**摘 要** **目的** 探讨 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号转导通路在白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )介导的人胚肺成纤维细胞(FB)活化中的作用。**方法** 体外培养人胚肺 FB,用 IL-1 $\beta$ 、JNK 抑制剂(SP600125)作用于细胞,采用免疫蛋白印迹法(Western blot)检测细胞 JNK/SAPK 磷酸化水平和  $\alpha$ -平滑肌激动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达,RT-PCR 方法检测纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)、神经生长因子(NGF)和  $\alpha$ -SMA mRNA 的相对表达量,ELISA 法检测培养上清液中 NGF 及白介素-6(IL-6)水平。**结果** 在 IL-1 $\beta$  刺激下,人胚肺 FB 中  $\alpha$ -SMA 及磷酸化 JNK 蛋白表达显著高于对照组,同时 PAI-1、FN、NGF 和  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达及培养上清液中 NGF、IL-6 水平均明显高于对照组( $P < 0.05$ );SP600125 显著抑制 IL-1 $\beta$  诱导的上述指标表达增加( $P < 0.05$ )。**结论** IL-1 $\beta$  促进人胚肺 FB 活化及细胞外基质聚集,JNK 信号转导通路参与这一过程。

**关键词** 白介素-1 $\beta$  JNK 信号通路 人胚肺成纤维细胞 细胞外基质

**中图分类号** R725.6

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.012

**Role of c-Jun N-terminal Kinase Signal Pathway on Interleukin-1 $\beta$  Induced Activation of Human Embryonic Lung Fibroblast.** Zhang Hui, Lin Beibei, Zhang Weixi, et al. Department of Pulmonology, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

**Abstract** **Objective** To explore the role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal pathway on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induced activation of human embryonic lung fibroblasts (FB). **Methods** The human embryonic lung fibroblasts were cultured in vitro and treated with IL-1 $\beta$  or JNK inhibitor SP600125. The expression of phosphorylated JNK (p-JNK) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) were examined by Western blot, and the plasminogen activator inhibitor of endothelial cell type (PAI-1), fibrinogen (FN), nerve growth factor (NGF) and  $\alpha$ -SMA mRNA were detected by RT-PCR. In addition, the concentrations of NGF and interleukin-6 (IL-6) levels in the culture supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** We found that under the treatment of IL-1 $\beta$ , the JNK signal pathway in human lung fibroblast was activated. The expression of p-JNK increased significantly compared with the control group ( $P < 0.05$ ). mRNA expressions of PAI-1, FN, NGF,  $\alpha$ -SMA, and the concentrations of NGF and IL-6 in the culture supernatant were all increased in the IL-1 $\beta$  treated groups ( $P < 0.05$ ). However, the SP600125 reversed the effect of IL-1 $\beta$  on the expression of p-JNK,  $\alpha$ -SMA, FN, NGF, and IL-6 mentioned above. **Conclusion** These findings provided evidence that JNK signal pathway may play an important role in the IL-1 $\beta$  induced human lung fibroblast activation and extracellular matrix synthesis.

**Key words** Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ); JNK; Human embryonic lung fibroblast; Extracellular matrix

气道炎症和气道重塑是支气管哮喘(简称哮喘)的主要病理学特征,其中气道重塑是气道壁结构改变而引起的不可逆或部分可逆的气流阻塞,是导致哮喘慢性化的主要原因。成纤维细胞(fibroblast, FB)是哮喘发生气道重塑的主要细胞之一,在慢性气道炎症作用下,可被活化并发生功能和表型改变,转变为肌

成纤维细胞(myofibroblasts, MF),产生大量细胞外基质沉积于基膜,促使气道重塑形成<sup>[1-3]</sup>。既往研究发现,JNK/SAPK 信号通路在哮喘大鼠气道重塑过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。因此,本研究以人胚肺 FB (MRC-5)为对象,选择 IL-1 $\beta$  作为 JNK 信号通路的上游代表物,探讨 JNK 信号通路在 IL-1 $\beta$  介导的人胚肺 FB 活化中的作用。

## 材料与方法

1. 材料:人胚肺 FB(MRC-5)细胞株(中科院细胞库);兔抗人 JNK 多克隆抗体、兔抗人磷酸化 JNK

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973232)

作者单位:325027 温州医科大学附属育英儿童医院呼吸科

通讯作者:李昌崇,主任医师,教授,电子信箱:wzlicheh@163.com

(p-JNK)多克隆抗体(美国 CST 公司);兔抗人  $\alpha$ -平滑肌激动蛋白( $\alpha$ -SMA)多克隆抗体(英国 Abcam 公司)、重组人 IL-1 $\beta$ (美国 R&D 公司);SP600125(美国 Sigma 公司);DMSO(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);ELISA 试剂盒(上海西塘生物科技有限公司);DMEM 细胞培养液和胎牛血清(美国 Gibco 公司);PCR 引物(上海基康生物技术有限公司)。

2. 细胞培养:MRC-5 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 中完全培养,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱,培养至 80% 融合时,换用无血清培养基同步化处理细胞 24h。取 7~15 代细胞用于实验。

3. 实验分组:将实验分为对照组(未干预组)、IL-1 $\beta$  组(10ng/ml IL-1 $\beta$ )、SP600125 组(20 $\mu$ mol/ml SP600125 + 10ng/ml IL-1 $\beta$ ),采用 Western blot 法检测细胞 p-JNK 蛋白和  $\alpha$ -SMA 的表达;用 RT-PCR 检测纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)、神经生长因子(NGF)和  $\alpha$ -SMA mRNA 的相对表达量;ELISA 检测培养上清液中 NGF 及 IL-6 的水平。

4. Western blot 法测定:细胞经干预后,提取细胞蛋白,采用 BCA 法测定浓度,于 -80℃ 中保存备用。蛋白经电泳、转膜、封闭后,加入用封闭液或牛血清白蛋白 V 稀释的抗体(稀释比 1:1000),于 4℃ 孵育过夜,二抗(稀释比 1:5000)室温 2h,ECL 发光试剂进行蛋白信号检测。对底片进行灰度扫描,利用 Quantity One 凝胶分析软件分析,以目的蛋白条带与内参条带累积吸光度(A)之比作为反映蛋白相对表达水平指标。

5. RT-PCR 法检测:以 Trizol 法提取各组细胞总 RNA,反转录成 cDNA 后行 PCR 扩增。PCR 反应体系总 25 $\mu$ l,扩增条件:94℃ 预变性 3min,94℃ 变性 30s,适当温度退火 30s(PAI-1 53℃,FN 55℃,NGF 61.8℃, $\alpha$ -SMA 60℃),72℃ 延伸 30s,进行循环(FN、 $\alpha$ -SMA 35 次,PAI-1、NGF 40 次),最后 72℃ 延伸 5min。 $\beta$ -actin 随目的基因的条件而扩增,PCR 产物于 4℃ 保存备用。PCR 引物序列见表 1。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 Gel-Pro Analyzer 3.2 凝胶数字成像系统扫描分析。以目的基因与内参的吸光度比值代表其 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

| 名称             |      | 引物序列(5'→3')             | 大小(bp) |
|----------------|------|-------------------------|--------|
| PAI-1          | 上游引物 | CCCTAGAGAACCTGGGAATGAC  | 174    |
|                | 下游引物 | TGCGGGCTGAGACTATGACA    |        |
| FN             | 上游引物 | TAGCCCTGTCCAGGAGTTCA    | 346    |
|                | 下游引物 | CTGCAAGCCTTCAATAGTCA    |        |
| NGF            | 上游引物 | CCAATAACAGTTTACCAAGGGAG | 326    |
|                | 下游引物 | AGGGCAGTGTCAAGGGAATG    |        |
| $\alpha$ -SMA  | 上游引物 | GCGTGGCTATTCTTCGTTAC    | 331    |
|                | 下游引物 | CATAGTGGTGCCCTGATAG     |        |
| $\beta$ -actin | 上游引物 | TGACGTGGACATCCGCCAAG    | 205    |
|                | 下游引物 | CTGGAAGGTGGACAGCGAGG    |        |

6. ELISA 法检测:设标准管 8 管,标准品浓度分别为 1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6、0pg/ml。每孔加入标准品或待测上清液,反应板充分混匀后置于 37℃ 恒温箱 120min。加入一抗工作液混匀,置 37℃ 恒温箱 60min。加入酶标抗体工作液,放置 37℃ 恒温箱孵育 30min。加入底物工作液,置 37℃ 恒温箱避光反应 15min,加中止液混匀。用酶标仪在 450nm 处测吸光值。以吸光度(A)为纵坐标,标准品浓度为横坐标,在坐标纸上画出标准曲线。根据样品吸光度(A)在该曲线图上查出相应目的的含量。

7. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件包进行统计分析处理,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐性者两两比较采用 LSD 检验,方差不齐者用 Tamhane's T2 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. SP600125 对 IL-1 $\beta$  刺激下 P-JNK 及  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的影响:10ng/ml IL-1 $\beta$  刺激下 p-JNK 蛋白表达显著高于对照组( $P < 0.05$ ),与对照组比较,IL-1 $\beta$  组  $\alpha$ -SMA 蛋白表达显著升高( $P <$

0.05)。与IL-1 $\beta$ 组比较,SP600125组 $\alpha$ -SMA蛋白的表达显著减低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图1、图2)。

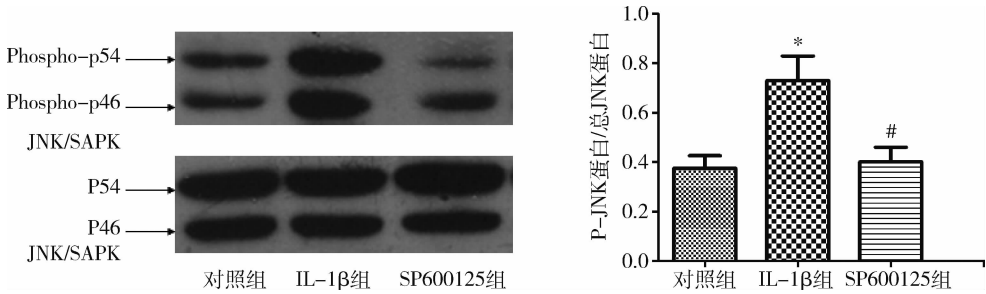


图1 各组细胞P-JNK/SAPK蛋白表达的变化  
与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与IL-1 $\beta$ 组比较,# $P < 0.05$

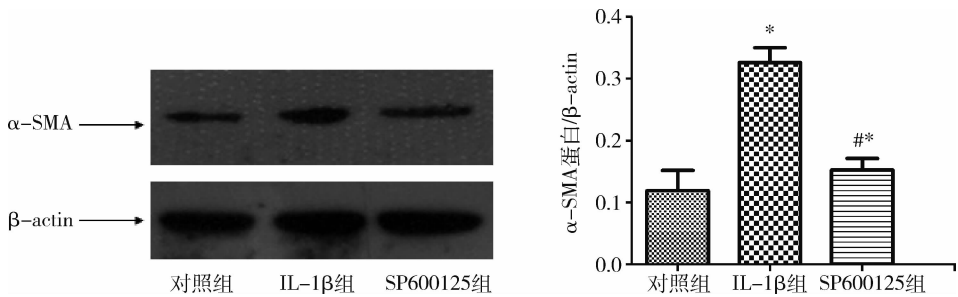


图2 各组细胞 $\alpha$ -SMA蛋白表达的变化  
与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与IL-1 $\beta$ 组比较,# $P < 0.05$

2. RT-PCR检测PAI-1、FN、NGF和 $\alpha$ -SMA mRNA相对表达量:在未干预的人胚肺FB中PAI-1、FN、NGF和 $\alpha$ -SMA mRNA均有低水平量的表达。

加入IL-1 $\beta$ 处理后PAI-1、FN、NGF和 $\alpha$ -SMA mRNA均明显高于对照组( $P < 0.05$ ),SP600125组较IL-1 $\beta$ 组有不同程度降低( $P < 0.05$ )(表2、图3)。

表2 各组细胞PAI-1、FN、NGF和 $\alpha$ -SMA mRNA表达的变化(% ,  $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别             | PAI-1 mRNA         | FN mRNA            | NGF mRNA           | $\alpha$ -SMA mRNA |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 对照组            | 0.37 $\pm$ 0.10    | 0.46 $\pm$ 0.02    | 0.04 $\pm$ 0.01    | 0.19 $\pm$ 0.08    |
| IL-1 $\beta$ 组 | 0.94 $\pm$ 0.13 *  | 0.99 $\pm$ 0.17 *  | 0.18 $\pm$ 0.04 *  | 0.74 $\pm$ 0.11 *  |
| SP600125组      | 0.66 $\pm$ 0.13 ** | 0.67 $\pm$ 0.18 ** | 0.11 $\pm$ 0.03 ** | 0.37 $\pm$ 0.10 ** |
| F              | 33.185             | 15.886             | 39.738             | 48.877             |
| P              | < 0.05             | < 0.05             | < 0.05             | < 0.05             |

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与IL-1 $\beta$ 组比较,# $P < 0.05$

3. ELISA检测培养上清液中NGF及IL-6的水平:IL-1 $\beta$ 组培养上清液中NGF水平(206.95  $\pm$  22.37pg/ml)及IL-6水平(2073.16  $\pm$  175.78pg/ml)均显著高于对照组(NGF 48.75  $\pm$  12.76pg/ml、IL-6 103.46  $\pm$  15.40pg/ml, $P < 0.05$ ),SP600125组培养上清液中NGF和IL-6水平较IL-1 $\beta$ 组显著降低( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义(图4)。

讨 论

有研究者认为,气道重塑的形成是由反复气道炎

症所导致的,在疾病后期才会出现,儿童哮喘不存在气道重塑。但是已有许多研究证实,哮喘气道重塑不仅发生在成人哮喘,也可在儿童哮喘中发生。

成纤维细胞(FB)与气道平滑肌(ASM)增殖是气道重塑的重要病理特征。活化的成纤维细胞将发生功能和表型的改变,转变为肌成纤维细胞(MF),而 $\alpha$ -SMA是这一转变过程的标志物。肌成纤维细胞具有较强的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、生长因子受体、生长因子或细胞因子、整合蛋白合成

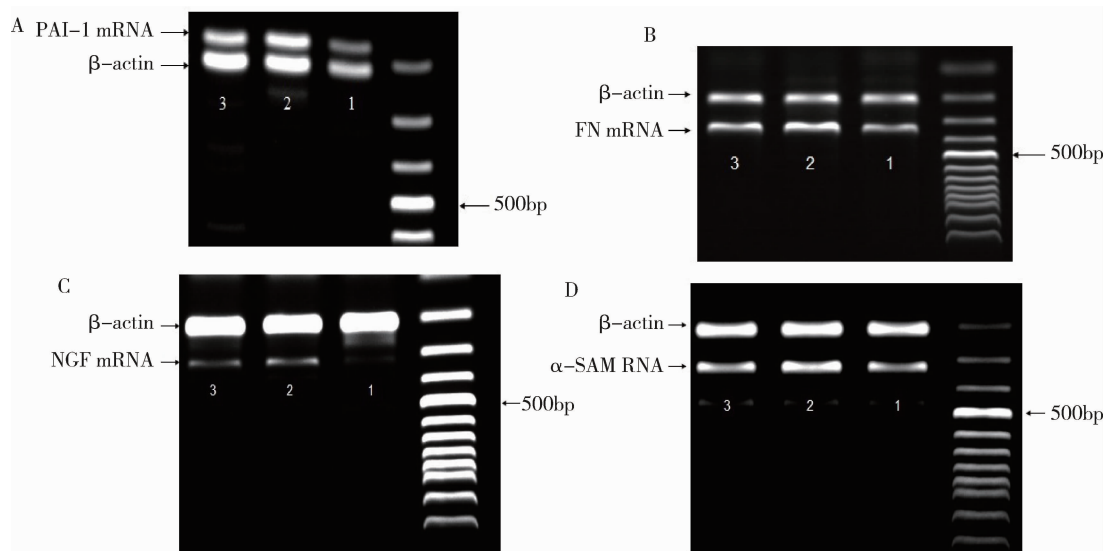
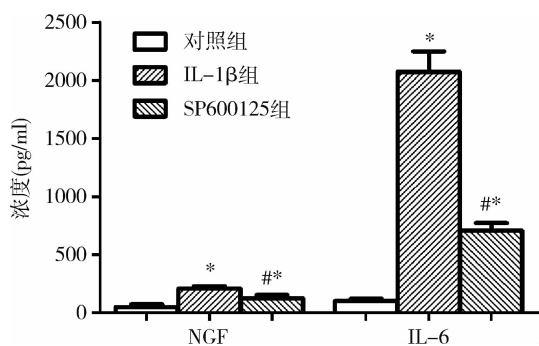
图 3 各组 PAI-1、FN、NGF 和  $\alpha$ -SMA 的 PCR 结果A. PAI-1; B. FN; C. NGF; D.  $\alpha$ -SMA。1. 对照组; 2. IL-1 $\beta$  组; 3. SP600125 组

图 4 各组细胞培养上清液中 NGF 及 IL-6 含量的变化

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 IL-1 $\beta$  组比较, #  $P < 0.05$ 

的能力,如 IL-6、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  等,进而增加肺组织的收缩性、降低肺顺应性,促使气道重塑的形成<sup>[5,6]</sup>。本研究发现,使用 IL-1 $\beta$  干预人胚肺 FB,其  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白的表达增加,提示 IL-1 $\beta$  可以促进成纤维细胞活化。

气道壁 ECM 沉积过多是引起气道纤维化和气流受阻的主要原因<sup>[7,8]</sup>。PAI-1 是纤维蛋白溶解系统的主要抑制剂,能抑制与细胞相关的蛋白水解酶,如基质金属蛋白酶 MMP 的活性,导致 ECM 沉积、纤维化发生,最终导致气道重塑<sup>[9,10]</sup>。Stevens 等<sup>[11]</sup> 对哮喘儿童研究发现,患儿呼吸道上皮细胞 PAI-1 mRNA 和蛋白水平表达明显增加,在细胞增殖和损伤修复中发挥重要作用。FN 可由成纤维细胞合成,与特异性受体结合后,通过 MAPK 或其他信号转导通路,促进相关基因转录,抑制炎症细胞凋亡和趋化运动,

调节炎症细胞生长、迁移、分化,并导致 ECM 沉积,参与气道重塑<sup>[12,13]</sup>。最近有关 NGF 在气道炎症、高反应性及重塑中的作用日益受到重视,而肺成纤维细胞是其来源细胞之一<sup>[14,15]</sup>。IL-1 $\beta$  是一种多功能细胞因子,能活化多种细胞,促进气道炎症细胞的趋化与黏附,诱导炎症介质的释放,参与多种疾病的发生与发展。Lappalainen 等<sup>[16]</sup> 发现在肺上皮细胞能表达人 IL-1 $\beta$  的转基因小鼠模型中,IL-1 $\beta$  可诱导成年小鼠肺部炎症,肺泡隔弹力纤维断裂,上皮下纤维化和气道壁增厚,增加基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-12 的表达及胶原沉积。本研究发现,IL-1 $\beta$  能促进人胚肺 FB PAI-1、FN、NGF mRNA 表达及培养上清液中 IL-6、NGF 分泌,提示 IL-1 $\beta$  促进细胞外基质聚集及细胞因子分泌,在气道纤维化和气道重塑中可能发挥重要作用,与前期研究结果一致。

JNK 是 MAPK 家族中的一员,通过调节炎症细胞、结构细胞、细胞因子和炎症介质的作用,参与气道重塑的形成<sup>[17,18]</sup>。本课题组前期动物实验发现,致敏的 SD 大鼠经 12 周变应原激发后,支气管壁厚度 (Wat)、平滑肌厚度 (Wam) 增加,肺组织 p-JNK 表达增强,且 Wat、Wam 与肺内 p-JNK 蛋白表达均呈显著正相关,提示 JNK 在慢性炎症及气道重塑中起重要作用;另外,血清和 BALF 中 IL-1 $\beta$  浓度增加,且 p-JNK 蛋白与血清、BALF 中 IL-1 $\beta$  浓度均呈显著正相关<sup>[19]</sup>。林蓓蓓等<sup>[20]</sup> 研究表明,JNK1 的表达与成纤维细胞增殖密切相关。本研究发现,使用 IL-

1 $\beta$  处理人胚肺 FB 后 p - JNK 显著增加,而采用 SP600125 阻断 JNK 通路可显著减少人胚肺 FB  $\alpha$  - SMA mRNA、蛋白以及 PAI - 1、FN、NGF 等 mRNA 的表达,以及培养上清液中 IL - 6、NGF 的分泌,提示 IL - 1 $\beta$  在促进成纤维细胞活化、细胞外基质聚集及细胞因子分泌中发挥重要作用,而且部分是通过 JNK 信号通路起作用的。

综上所述,本研究表明,IL - 1 $\beta$  可通过活化 JNK 信号通路促进成纤维细胞活化、细胞外基质聚集及细胞因子分泌,在哮喘气道重塑中起重要作用。阻断 JNK 的活化可能成为哮喘气道重塑的有效防治途径之一。

### 参考文献

- Khan MA, Assiri AM, Broering DC. Complement mediators: key regulators of airway tissue remodeling in asthma[J]. J Translat Med, 2015, 13(1): 1 - 9
- Michalik M, Soczek E, Kosińska M, *et al.* Lovastatin - induced decrease of intracellular cholesterol level attenuates fibroblast - to - myofibroblast transition in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 704(1): 23 - 32
- Shi Y, Dong Y, Duan Y, *et al.* Substrate stiffness influences TGF -  $\beta$ 1 - induced differentiation of bronchial fibroblasts into myofibroblasts in airway remodeling[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(2): 419 - 424
- 林立, 管小俊, 李昌崇, 等. c - Jun 氨基末端激酶磷酸化在支气管哮喘大鼠气道重塑中的作用及糖皮质激素的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(3): 188 - 192
- Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts[J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(3): 334 - 337
- Pascual RM, Peters SP. The irreversible component of persistent asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(5): 883 - 890
- Bianchetti L, Barczyk M, Cardoso J, *et al.* Extracellular matrix remodelling properties of human fibrocytes[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(3): 483 - 495
- Caroline B, Jonathan C, Zena W. Remodelling the extracellular matrix in development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(12): 786 - 801
- Miyamoto S, Hattori N, Senoo T, *et al.* Intra - airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor - 1

attenuates allergic asthma in mice[J]. Ame J Physiol - Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(6): L908 - L916

- Cho SH, Hong SJ, Chen H, *et al.* Plasminogen activator inhibitor - 1 in sputum and nasal fluids increases in asthmatics during common colds[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(5): 1465 - 1467
- Stevens PT, Kicic A - Sutanto EN, *et al.* Dysregulated repair in asthmatic paediatric airway epithelial cells: the role of plasminogen activator inhibitor - 1[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(12): 1901 - 1910
- Ge Q, Zeng Q, Tjin G, *et al.* Differential deposition of fibronectin by asthmatic bronchial epithelial cells[J]. Ame J Physiol - Lung Cell Mol Physiol, 2015, 309(10): L1093 - L1102
- Nishihara - Fujihara M, Shoji S, Maeda I, *et al.* Involvement of fibronectin and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration for the process of airway remodeling[J]. Allergol Int, 2010, 59(3): 267 - 275
- Na Zang, Simin Li, Wei Li, *et al.* Resveratrol suppresses persistent airway inflammation and hyperresponsiveness might partially via nerve growth factor in respiratory syncytial virus - infected mice[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 121 - 128
- Ayşe Kılıç, Sanchaita Sriwal Sonar, Ali Oender Yildirim, *et al.* Never growth factor induces type III collagen production in chronic allergic airway inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 128(5): 1058 - 1066
- Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, *et al.* Interleukin - 1 $\beta$  causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(4): 311 - 318
- Tang H, Sun Y, Shi Z, *et al.* YKL - 40 induces IL - 8 expression from bronchial epithelium via MAPK (JNK and ERK) and NF -  $\kappa$ B pathways, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration[J]. J Immunol, 2013, 190(1): 438 - 446
- van der Velden JL, Ye Y, Nolin JD, *et al.* JNK inhibition reduces lung remodeling and pulmonary fibrotic systemic markers[J]. Clin Translat Med, 2016, 5(1): 36 - 54
- 林立, 李昌崇, 管小俊, 等. 哮喘气道重塑大鼠肺组织磷酸化 JNK、血清/BALF 白介素 1 $\beta$  表达变化[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(10): 952 - 955
- 林蓓蓓, 张慧, 林立, 等. JNK1 基因沉默对肺成纤维细胞增殖的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(3): 34 - 37

(收稿日期: 2016 - 12 - 24)

(修回日期: 2017 - 01 - 11)

(上接第 152 页)

- Beguín Y, Aapro M, Ludwig H, *et al.* Epidemiological and nonclinical studies investigating effects of iron in carcinogenesis—A critical review[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(1): 1 - 15
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, *et al.* Heparin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. Science, 2004, 306(5704): 2090 - 2093
- Fleming RE, Sly WS. hepcidin: a putative iron - regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic dis-

ease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(15): 8160 - 8162

- 史玉娟, 潘湘涛. 癌性贫血患者血清 BMP6 和 BMP4 水平变化及其与铁调素和 sHJV 的关系[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(2): 41 - 43
- 程旭, 陆晔, 王金湖, 等. 癌性贫血患者 Hep、EPO、FPN 和 TFR2 的表达特点及其意义[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(1): 238 - 240

(收稿日期: 2017 - 02 - 11)

(修回日期: 2017 - 03 - 07)