不同剂量 FTY720 对颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡的抑制作用

蔡建勇　吴　艳　林　群　巴华君　陆　川　陈献东　陈茂华　孙　军

摘　要　目的　揭示不同剂量 FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织神经细胞凋亡的影响及相关机制。**方法**　将 175 只大鼠随机分成假手术组、模型组、小剂量组、中剂量组和大剂量组，每组 35 只，再根据 2、6、12h、1、2、3 和 5 天 7 个时间点分成 7 个亚组，每组 5 只。采用 Feeney 自由落体损伤装置建立大鼠颅脑损伤模型。小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠分别按 0.5、1 和 2mg/kg 剂量予 FTY720 腹腔注射，其他组大鼠腹腔注射 1ml 生理盐水。检测各时间点海马组织凋亡神经细胞、caspase－3 蛋白活性和白介素－1β、肿瘤坏死因子－α 及白介素－6 浓度。**结果**　模型组大鼠海马组织凋亡神经细胞比例、caspase－3 蛋白活性和白介素－1β、肿瘤坏死因子－α 和白介素－6 浓度较假手术组显著升高，小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织上述指标均较模型组显著下降，且作用效果呈现剂量依赖性。**结论**　FTY720 可能通过抑制中枢炎性反应从而减少颅脑损伤大鼠海马组织神经细胞凋亡，且呈现剂量依赖性。

关键词　FTY720　大鼠　炎性反应　神经细胞凋亡　颅脑损伤

中图分类号　R651.1　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.022

Inhibitory Effect of Different Dosages of FTY720 on Neuronal Cellular Apoptosis of Rats with Traumatic Brain Injury. *Cai Jianyong, Wu Yan, Lin Qun, et al. Department of Neurosurgery, The Central Hospital of Wenzhou City, Zhejiang 325000, China*

Abstract　Objective　To investigate the effect of different dosages of FTY720 on neuronal cellular apoptosis of hippocampus tissues in rats with traumatic brain injury and the related mechanism. **Methods**　Totally 175 rats were randomly assigned to sham－operation group, model group, small dosage group, medium dosage group and large dosage group with 35 rats in each group. According to 7 time points, i.e. hour 2, hour 6, hour 12, day 1, day 2, day 3 and day 5, each group was divided to 7 subgroups with 5 rats in each subgroup. Feeney free fall injury device was utilized to establish rat craniocerebral injury model. Rats in small dosage group, medium dosage group and large dosage group were administrated intraperitoneally with 0.5, 1 and 2 mg/kg FTY720 respectively. Rats in other groups were given an intraperitoneal injection of normal saline. At each time point, the apoptotic neuronal cells, activity of caspase 3 protein and concentrations of interleukin－1beta, tumor necrosis factor－alpha and interleukin－6 were determined in hippocampus tissues. **Results** Compared with sham－operation group, the apoptotic neuronal cells, activity of caspase 3 protein and concentrations of interleukin－1beta, tumor necrosis factor－alpha and interleukin－6 in hippocampus tissues were obviously elevated in model group. The preceding variables in hippocampus tissues were statistically significantly lower in small dosage group, medium dosage group and large dosage group than in model group in a dose－dependent manner. **Conclusion**　FTY720 could inhibit inflammation in central nervous system and subsequently suppress neuronal cell apoptosis of the rat hippocampus tissues following trauma brain injury in a dose－dependent manner.

Key words　FTY720; Rat; Inflammatory reaction; Neuronal cell apoptosis; Traumatic brain injury

药物是颅脑损伤后继发性脑损伤治疗的重要组成部分之一，而抑制神经系统免疫反应是降低继发性脑损伤的重要手段[1,2]。FTY720 是一种由冬虫夏草抽提物中具有免疫作用的物质改造而成的新型免疫抑制剂[3]。它对免疫抑制具有双向调节作用，在体内抑制免疫反应发生的同时不削弱机体对病毒的免疫应答及免疫记忆能力，进而不增加机体感染的发生率[4]。FTY720 用于多发性硬化症和肾移植排斥反应的治疗已进入临床试验阶段[5]。FTY720 可显著改善蛛网膜下腔出血大鼠的认知功能[6]。笔者既往研究发现，FTY720 可有效抑制颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡，改善大鼠神经功能[7,8]。无论如何，目前少有研究揭示 FTY720 注射剂量和疗效的关系。本研究采用不同剂量 FTY720 腹腔注射治疗大鼠颅脑损伤，观察其对大鼠海马组织炎性反应及神经细胞凋亡的抑

基金项目：浙江省实验动物科技计划项目（2014C37029）
作者单位：325200　温州市中心医院神经外科
通讯作者：蔡建勇，电子信箱：cjy19761976@126.com

制作用,从而评价其疗效和剂量依赖关系。

材料与方法

1. 材料:健康 Wistar 大鼠(南京大学模式动物研究所),雄性,清洁级,体重 250 ~ 300g;FTY720(批号:SML0700,美国 Sigma 公司)临用时根据用量以生理盐水配成 1ml 注射液;酶标仪(型号:MK3,美国 Thermo Scientific 公司);白介素 - 1β ELISA 试剂盒(批号:M6000B,美国 R&D 公司),肿瘤坏死因子 - α ELISA 试剂盒(批号:MTA00B,美国 R&D 公司),白介素 - 6 ELISA 试剂盒(批号:MLB00C,美国 R&D 公司);TUNEL 试剂盒(批号:MK1024,武汉博士德生物工程有限公司);caspase - 3 蛋白活性检测试剂盒(批号:T9281,美国 Livemore 公司)。

2. 动物处理方法:将 175 只大鼠随机分成假手术组、模型组、小剂量组、中剂量组和大剂量组,每组 35 只;再根据 2、6、12h、1、2、3 和 5 天 7 个时间点分成 7 个亚组,每组 5 只。大鼠予 50mg/kg 戊巴比妥钠腹腔麻醉后,在右侧冠状缝后 1mm、中线旁开 2mm 处切开头皮,钻一直径 5mm 骨孔,采用 Feeney 自由落体损伤装置,用 40g 重的击锤从 25cm 处自由坠落冲击撞杆,打击深度 5mm,缝合头皮。假手术组大鼠切开头皮,颅骨钻孔后缝合头皮,不作外力打击。假手术组和模型组大鼠手术操作完成前 0.5h 腹腔注射 1ml 0.9% 氯化钠注射液,小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠手术操作完成前 0.5h 按 0.5、1 和 2mg/kg 剂量腹腔注射 FTY720。在手术操作完成后 2、6、12h、1、2、3 和 5 天,每个亚组大鼠以 80mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉,断头处死,分离海马组织。大鼠受外力打击后有一过性的呼吸抑制,0.5h 内基本恢复正常。各组大鼠手术操作后有少量死亡,大鼠死亡后补充成活大鼠,保证每亚组 5 只大鼠。

3. 指标检测:采用 TUNEL 法检测大鼠海马组织凋亡神经细胞,细胞核染色呈棕黄色或棕红色定义为细胞染色阳性,在 Olympus - CH 光学显微镜下计算 10 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞,总计 1000 个细胞,计算平均阳性率(%)。采用四肽荧光底物法检测大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性,以未加脑组织时的荧光强度为参照值,计算荧光强度,最终比较相对荧光强度。采用 ELISA 法测定大鼠海马组织肿瘤坏死因子 - α、白介素 - 1β 和白介素 - 6 浓度,结果表示为 pg/mg 脑组织。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,指标测定均重复 3 次,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用单变量方差分析,组间两两比较采用 *LSD* 法,多组多个时间点的比较采用重复测量方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织凋亡神经细胞比例的影响:从图 1 可知,模型组大鼠海马组织凋亡神经细胞比例较假手术组显著升高(P 均 <0.05),小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织凋亡神经细胞比例较模型组显著降低(P 均 <0.05),大剂量组大鼠海马组织凋亡神经细胞比例较小剂量组显著下降(P 均 <0.05),而小剂量组和中剂量组或中剂量组和大剂量组大鼠海马组织凋亡神经细胞比例比较,差异均未有统计学意义(P 均 >0.05)。经重复测量方差分析,FTY720 对神经细胞凋亡的抑制作用呈现剂量依赖性(P 均 <0.05)。

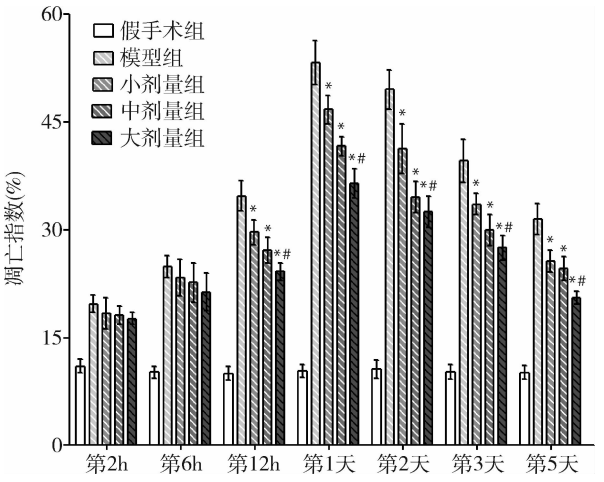

图 1　FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织凋亡神经细胞比例的影响

与模型组比较,* $P < 0.05$;与小剂量组比较,# $P < 0.05$

2. FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性的影响:从图 2 可知,模型组大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性较假手术组显著升高(P 均 <0.05),小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性较模型组显著降低(P 均 <0.05),大剂量组大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性较小剂量组显著下降(P 均 <0.05),而小剂量组和中剂量组或中剂量组和大剂量组大鼠海马组织 caspase - 3 蛋白活性比较,差异无统计学意义(P 均 >0.05)。经重复测量方差分析,FTY720 对 caspase - 3 蛋白活性的抑制作用呈现剂量依赖性(P 均 <0.05)。

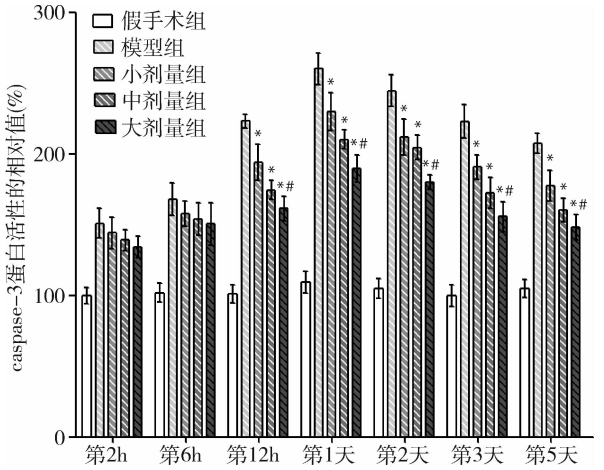

图 2　FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织 caspase－3 蛋白活性的影响

与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与小剂量组比较，$^{\#}P<0.05$

3. FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度的影响：从图 3 可知，模型组大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度较假手术组显著升高（P 均 <0.05），小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度较模型组显著降低（P 均 <0.05），大剂量组大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度较小剂量组显著下降（P 均 <0.05），而小剂量组和中剂量组或中剂量组和大剂量组大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度比较，差异无统计学意义（P 均 >0.05）。经重复测量方差分析，FTY720 对海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度的抑制作用呈现剂量依赖性（P 均 <0.05）。

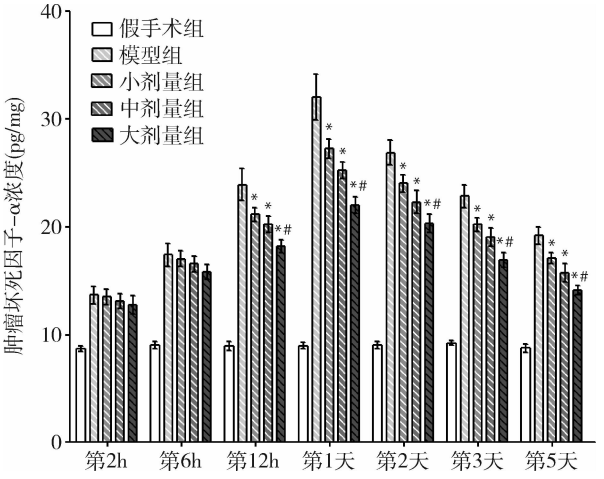

图 3　FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织肿瘤坏死因子－α 浓度的影响

与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与小剂量组比较，$^{\#}P<0.05$

4. FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织白介素－6 浓度的影响：从图 4 可知，模型组大鼠海马组织白介素－6 浓度较假手术组显著升高（P 均 <0.05），小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织白介素－6 浓度较模型组显著降低（P 均 <0.05），大剂量组大鼠海马组织白介素－6 浓度较小剂量组显著下降（P 均 <0.05），而小剂量组和中剂量组或中剂量组和大剂量组大鼠海马组织白介素－6 浓度比较，差异无统计学意义（P 均 >0.05）。经重复测量方差分析，FTY720 对海马组织白介素－6 浓度的抑制作用呈现剂量依赖性（P 均 <0.05）。

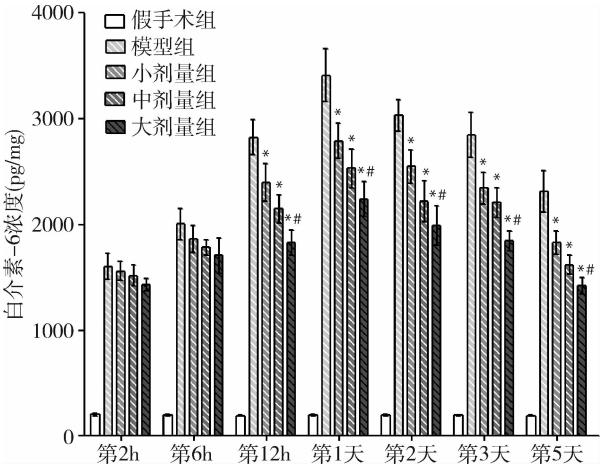

图 4　FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织白介素－6 浓度的影响

与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与小剂量组比较，$^{\#}P<0.05$

5. FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织白介素－1β 浓度的影响：从图 5 可知，模型组大鼠海马组织白介素－1β 浓度较假手术组显著升高（P 均 <0.05），小剂量组、中剂量组和大剂量组大鼠海马组织白介素－1β 浓度较模型组显著降低（P 均 <0.05），大剂量组大鼠海马组织白介素－1β 浓度较小剂量组显著下降（P 均 <0.05），而小剂量组和中剂量组或中剂量组和大剂量组大鼠海马组织白介素－1β 浓度比较，差异无统计学意义（P 均 >0.05）。经重复测量方差分析，FTY720 对海马组织白介素－1β 浓度的抑制作用呈现剂量依赖性（P 均 <0.05）。

讨　　论

颅脑损伤是一种常见的外伤形式，预后往往不理想。原发性脑损伤和继发性脑损伤共同作用影响颅脑损伤患者的预后。使用药物可减轻继发性脑损伤，从而改善患者预后。炎性反应和细胞凋亡是颅脑损伤后继发性脑损伤的重要机制。一般来说，颅脑损伤

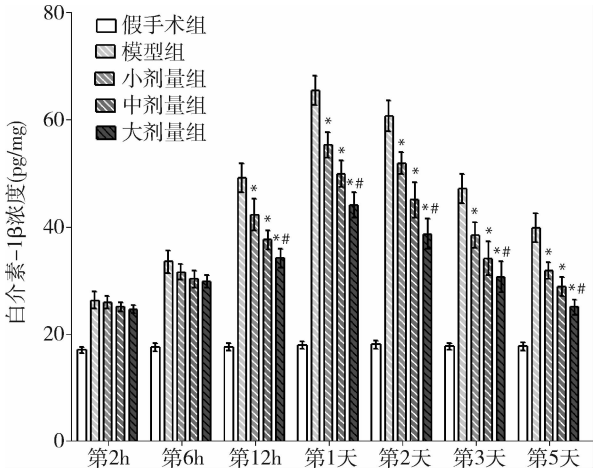

图 5　FTY720 对颅脑损伤大鼠海马组织白介素 -1β 浓度的影响

与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与小剂量组比较，$^{\#}P<0.05$

可激活中枢神经系统胶质细胞，从而大量释放肿瘤坏死因子 -α、白介素 -1β 和白介素 -6 等细胞因子，进而激活凋亡蛋白 caspase -3。caspase -3 作为凋亡执行者，可直接降解胞内结构蛋白和功能蛋白，引起凋亡[9~13]。因此，抑制炎性反应，降低细胞凋亡可减少继发性脑损伤，从而改善颅脑损伤预后。FTY720 由冬虫夏草抽提物中具有免疫抑制作用的 ISP -I 进行结构改造而成的，属于鞘氨醇 -1 -磷酸盐受体阻滞剂[3]。FTY720 作为一种新型的免疫抑制剂，在体外以无活性的形式存在，在体内需经鞘氨醇激酶 2 磷酸化而转化为具有生物活性的 FY720 异构体而发挥作用[4]。目前，FTY720 在临床上主要用于治疗肝肾器官移植后的排斥反应及皮炎、重症肌无力等免疫紊乱/障碍疾病[5]。

既往研究已经显示，FTY20 治疗动物脑损伤具有显著效果，可显著抑制神经系统炎性反应，抑制神经细胞凋亡，改善神经功能[6~8]。FTY720 用于动物（主要是大鼠）急性出血性、外伤性或缺血性脑损伤治疗时均选择 1mg/kg 剂量[14~16]。本研究进一步分析 FTY720 治疗颅脑损伤大鼠的剂量依赖关系。本研究发现，0.5、1 和 2mg/kg FTY720 腹腔注射均显著抑制大鼠海马组织神经细胞凋亡和 caspase -3 活性，同时也降低脑组织肿瘤坏死因子 -α、白介素 -1β 和白介素 -6 浓度。重复测量方差显示 FTY720 治疗大鼠颅脑损伤存在剂量效应关系。FTY720 可降低体外培养的胶质细胞分泌炎性因子，阻止大鼠脑外伤后炎性细胞在皮质的聚集，抑制大鼠脑出血后脑内淋巴细胞浸润，从而表现中枢神经系统抗炎作用[14,17,18]。FTY720 也能有效地抑制大鼠短暂性脑缺血后神经细胞的死亡和降低大鼠脑出血后脑水肿，改善脑功能[15,16]。因此笔者推测，FTY720 抑制大鼠颅脑损伤后神经凋亡效果显著，且存有疗效 -剂量依赖关系，而它的作用机制可能与 FYT720 的中枢神经系统抗炎作用有关。

Budde 等[19]首次发现了 FTY720 有相对较长的吸收时相，药物半衰期为 89 ~ 157h。这也说明了本研究 FTY20 一次用药可以保持 5 天疗效的原因。为了确保药物早期应用从而增加疗效，本研究把 FTY20 的用药时间定在了实验性创伤之前。当然，用药时间不符合临床实际情况，这是本研究的缺陷。因此，不同用药时间对 FTY20 药效的影响有待于进一步研究证实。

参考文献

1　McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of traumatic brain injury [J]. Neurosurg Clin N Am, 2016,27(4):397 -407

2　de Rivero Vaccari JC, Brand FJ, Berti AF, *et al*. Mincle signaling in the innate immune response after traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2015,32(4):228 -236

3　Pitman MR, Woodcock JM, Lopez AF, *et al*. Molecular targets of FTY720 (fingolimod) [J]. Curr Mol Med, 2012,12(10):1207 -1219

4　Patmanathan SN, Yap LF, Murray PG, *et al*. The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod [J]. J Cell Mol Med, 2015,19(10):2329 -2340

5　Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non -steroidal anti -inflammatory drugs [J]. J Pain Res, 2015, 8(1):105 -118

6　董晓巧，俞文华，杜权，等. 芬戈莫德改善蛛网膜下腔出血大鼠认知功能及其机制研究 [J]. 中华危重症医学杂志, 2017,10(1): 18 -22

7　蔡建勇，林群，巴华君，等. FTY720 对颅脑损伤大鼠神经细胞凋亡的抑制作用[J]. 浙江医学, 2016, 38(11):776 -778

8　蔡建勇，吴艳，巴华君，等. FTY720 改善颅脑损伤大鼠神经功能的机制研究 [J]. 中华危重症医学杂志, 2016, 9(4): 240 -244

9　Creagh EM. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways [J]. Trends Immunol, 2014, 35 (12): 631 -640

10　Park HH. Structural features of caspase -activating complexes [J]. Int J Mol Sci, 2012,13(4):4807 -4818

11　Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo [J]. Genes Cells, 2012,17(2):83 -97

12　Hinson HE, Rowell S, Schreiber M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: a systematic review [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 78(1): 184 -191

（下转第 108 页）

有丰富的锌离子。这些锌离子被发现可以在突触活动中扮演神经递质的角色来调节神经元的兴奋性。本实验的原子吸收光谱技术结果发现,NPP 组的脊髓后角锌离子的含量明显降低,说明在小鼠学习记忆及自主性行为发生障碍的同时控制感觉传递的脊髓后角中锌离子含量降低,且 LZn - NPP 组锌离子更低,且机械痛阈更低,说明锌离子参与了脊髓后角的痛觉传递及对小鼠的学习记忆具有保护作用,但如何对小鼠学习记忆起保护作用需要基因分子水平的研究,锌离子如何参与痛觉传递需开展深入探讨。

参考文献

1 Jeong NY, Shin YH, Jung J. Neuropathicpainin hereditary peripheral-neuropathy[J]. J Exerc Rehabil, 2013, 9(4): 397 - 399

2 Madronal N, Gruart A, Sacktor TC, *et al*. PKMzeta inhibition reverses learning - induced increases in hippocampal synaptic strength and-memony during trace eyeblink conditionin[J]. PLoS One, 2010, 5(4): 10400

3 Clark AK, Old EA, Malcangio M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives[J]. J Pain Res, 2013, 6: 803 - 814

4 张莉,王月静. 锌对神经病理性疼痛模型小鼠脊髓磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白表达的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(11): 1174 - 1177

5 胡义凤,刘健,杨建军,等. 神经病理性疼痛对大鼠学习记忆功能和海马脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(4): 363 - 367

6 刘虹,韩芳,石玉秀. 创伤后应激障碍大鼠海马神经元凋亡中 Caspase - 12 的表达[J]. 解剖学报, 2014, 45(4): 452 - 456

7 Mirzayi M, Hekmatshoar M. Study of electrical conductivity and memory switching in the zine - vanadium - phosphate glass [J]. Physica B: Physics of Condensed Matter, 2013, 420: 70 - 73

8 Tahmasebi Boroujeni S, Naghdi N, Shahbazi M, *et al*. The effect of severe zinc deficiency and zinc supplement on spatial learning and memory[J]. Biol Trace Elem Res, 2009, 130(1): 48 - 61

9 Frederickson CJ, Moncrieff DW. Zinc - containing neurons[J]. Signals, 1994, 3(3): 127 - 139

10 张莉,王月静. 锌对神经病理性疼痛模型小鼠脊髓磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白表达的影响[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(11): 1174 - 1177

11 Jo SM, Danscher G, Schroder HD, *et al*. Depletion of vesicular zinc in dorsal horn of spinal cord causes increased neuropathic pain in mice [J]. Biometals, 2008, 21 (2): 151 - 158

12 Chaplan SR, Baeh FW, Pogrel JW, *et al*. Quantitative assessment of tactile allodynia in the ratpaw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55 - 63

13 Cimadevilla JM, Arias JL. Different vulnerability in female's spatial behavior after unilateral hippocampal inactivation[J]. Neurosci Lett, 2008, 439: 89 - 93

14 Cirulli F, Berry A, Alleva E. Intracerebroventricular administration of brain - derived neurotrophic factor in adult rats affects analgesia and spontaneous behavior but not memory retention in a Morris Water Maze task[J]. Neurosci Lett, 2000, 287: 207 - 210

15 Florek S, Becker - Ross H. High - resolution spectrometer for atomic spectrometry[J]. J Anal At Spectrom, 1995, 10: 145 - 147

16 Taylor A, Branch S, Day MP, *et al*. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages[J]. J Anal At Spectrom, 2011, 26: 653 - 692

17 Berbari NF, Bishop GA, Askwith CC, *et al*. Hippocampal neurons possess primary cilia in culture[J]. J Neurosci Res, 2007, 85: 1095 - 1100

18 Banker G, Goslin K. Developments in neuronal cell culture[J]. Nature, 1988, 336: 185 - 186

19 Attal N, Lanteri - Minet M, Laurent B, *et al*. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey [J]. Pain, 2011, 152: 2836 - 2843

20 Jensen MP, Chodroff MJ, Dworkin RH. The impact of neuropathic pain on health - related quality of life: review and implications[J]. Neurology, 2007, 68: 1178 - 1182

(收稿日期:2017 - 07 - 01)
(修回日期:2017 - 11 - 02)

(上接第 99 页)

13 Abdul - Muneer PM, Schuetz H, Wang F, *et al*. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60(2): 282 - 291

14 Rolland WB, Lekic T, Krafft PR, *et al*. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2013, 241(1): 45 - 55

15 Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, *et al*. Activation of sphingosine 1 - phosphate receptor - 1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats [J]. Stroke, 2010, 41(2): 368 - 374

16 Rolland WB 2nd, Manaenko A, Lekic T, *et al*. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(2): 213 - 217

17 Janssen S, Schlegel C, Gudi V, *et al*. Effect of FTY720 - phosphate on the expression of inflammation - associated molecules in astrocytes in vitro [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6171 - 6177

18 Zhang Z, Zhang Z, Fauser U, *et al*. FTY720 attenuates accumulation of EMAP - Ⅱ$^+$ and MHC - Ⅱ$^+$ monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 307 - 314

19 Budde K, Schmouder RL, Brunkhorst R, *et al*. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(4): 1073 - 1083

(收稿日期:2017 - 10 - 10)
(修回日期:2017 - 11 - 07)