四君子汤对脾气虚证模型大鼠小肠葡萄糖吸收功能作用的影响

刘 佳 郭文峰 任 理 陈蔚文

摘要 目的 观察四君子汤对脾气虚证模型大鼠小肠葡萄糖吸收功能的影响。**方法** 通过颈部皮下注射利血平建立脾气虚证大鼠模型,观察大鼠体重及尿 D-木糖排泄率变化,通过在体空肠灌流收集并检测葡萄糖吸收量,收集小肠黏膜,检测葡萄糖运载蛋白 2(GLUT2)蛋白及 mRNA 表达变化。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠体重及尿 D-木糖排泄率均降低,同时伴有葡萄糖吸收的下降以及 GLUT2 蛋白及mRNA 表达的降低,通过给予四君子汤治疗,四君子汤组在各指标恢复上均优于自然恢复组。**结论** 四君子汤能够促进利血平致脾气虚证模型大鼠小肠吸收葡萄糖功能恢复。

关键词 四君子汤;脾气虚证;葡萄糖;小肠吸收;葡萄糖运载蛋白 2

Effect of Sijunzi Decoction on the Intestinal Glucose Absorption in Model Rats of Pi-qi Deficiency Syndrome: an Experimental Research

LIU Jia, GUO Wen-feng, REN Li, and CHEN Wei-wen *Pi-Wei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Sijunzi Decoction (SD) on the intestinal absorption of glucose in model rats of Pi-qi deficiency syndrome (PQDS). **Methods** PQDS rat model was established by subcutaneous injection of reserpine from the neck. The body weight and urine D-xylose excretion rates were measured. The glucose uptake rate was measured by jejunum perfusion. The intestinal mucosa was collected. The glucose transporter-2 (GLUT2) protein and mRNA expression levels were detected. **Results** Compared with the normal control group, the body weight and D-xylose excretion rates decreased in the model group. Meanwhile, the glucose uptake and GLUT2 protein and mRNA expression levels decreased in the model group. The aforesaid indices were improved in the SD group. **Conclusion** SD could promote the recovery of glucose uptake in the small intestine of reserpine induced PQDS rats.

KEYWORDS Sijunzi Decoction; Pi-deficiency syndrome; glucose; intestinal absorption; glucose transporter-2

脾气虚证的动物模型的造模方法种类繁多,目前应用最广的主要包括泻下法、偏食法、饮食失节法、综合法(破气苦降加饮食失节法、劳倦加饮食失节法、多因素、多途径造模法)、运用西药的不良反应复制模型等[1-9]。利血平造模法属于运用西药的不良反应复制模型的方法之一,具有重复性较好,整体表现较为接近临床脾气虚证表现等优点[10]。四君子汤作为临床常用治疗脾气虚证的基础方,由人参(去芦)、白术、茯苓(去皮)、炙甘草各等分组成,具有益气健脾之功效,为古今治疗脾胃气虚证的常用方剂。

D-木糖排泄率被列为公认的脾气虚证诊断参考指标。D-木糖是一种单糖,主要由空肠吸收,不经代谢直接由尿排出,因此其尿排泄率可以反映空肠对单糖的吸收水平。评价药物在肠道吸收的方法有离体法、在体法和体内法等多种方法[11],而目前在体肠灌流方法的应用越来越多,主要被应用于药物的吸收上,它能够反映出小肠吸收功能的状态,可以用来评价小肠葡萄糖吸收的情况。

葡萄糖运载蛋白 2(GLUT2)位于小肠黏膜上皮细胞细胞膜上,是介导易化扩散葡萄糖吸收的蛋白转运体。在高糖浓度刺激时,经 GLUT2 为葡萄糖吸收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072753)

作者单位:广州中医药大学脾胃研究所(广州 510405)

通讯作者:郭文峰,Tel:020 - 36585444,E-mail:guowenfeng@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2013.10.1389

的主要途径。GLUT2 蛋白及 mRNA 表达的变化与小肠吸收葡萄糖功能的水平密切相关。

材料与方法

1　材料

1.1　动物及分组　雌性 SD 大鼠,SPF 级,体重为 200 ~230 g,共 15 只,由广东省实验动物中心提供(合格证号:4407208146)。按照体重分为正常对照组(6 只)及模型组(9 只)。

1.2　药物　潞党参、云茯苓、白术、炙甘草(购于广州杏园春药房),按照重量比 3∶3∶3∶2 组成(即党参 60 g　云茯苓 60 g　白术 60 g　炙甘草 40 g),加水 2.2 L,浸泡 30 min,煎煮 2 h/次,共煎煮 2 次,水提液两层纱布过滤,合并滤液,旋转蒸发仪 70 ℃,浓缩至 220 mL,根据本实验室前期研究[12],确定四君子汤合适的剂量浓度,即得到浓缩液每毫升含生药量 1.0 g。利血平注射液(1 mg/mL,广东邦民制药厂有限公司批号:110907)。

1.3　试剂与仪器　对溴苯胺(韶远化学科技上海有限公司 CAS 106-40-1),硫脲(天津市大茂化学试剂厂,批号:20101208),D-木糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20101026),冰乙酸、浓硫酸、苯酚均为分析纯。GLUT2 抗体(ABCam 公司),GAPDH(上海康成生物,货号:KC-5G5),Goat anty-Rabbit IgG(Southern Biotech,货号:6170 -05),定量 PCR 用 SYBR Green qPCR SuperMix(Invitrogen 公司)。

Krebs-Ringer 缓冲液配制:氯化钠 7.02 g,氯化钾 0.3353 g,硫酸镁 0.12 g,磷酸氢二钠 0.261 g,磷酸二氢钠 0.0246 g,氯化钙 0.1375 g,碳酸氢钠 2.1 g,溶于 1 L 双蒸水中,调节 pH 值至 7.4,临用前预热至 37 ℃。

2%对溴苯胺溶液配制:取对溴苯胺 2 g 溶于 100 mL以硫脲饱和过的冰乙酸上清液中,即配即用,避光保存。

紫外分光光度计(UV mini1240 型,日本岛津公司);电热恒温水浴锅(DK-S26 型,上海精宏试验设备有限公司);分析天平(AUM-120D 型,日本岛津公司);蠕动泵(BT101L 型,保定雷弗流体科技有限公司);定量 PCR 仪(ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System);酶标仪(MK3 型,赛默飞世尔上海仪器有限公司);电泳仪(BG-Power 600i,北京百晶生物技术有限公司);核酸蛋白测定仪(德国艾本德公司)。

2　方法

2.1　脾气虚证大鼠模型的建立　参照文献[13]。正常对照组颈部皮下注射生理盐水,模型组颈部皮下注射利血平,根据预实验结果,确定注射剂量为每天 0.33 mg/kg,用生理盐水按照体积比 1∶2 配制,连续注射 7 天。根据大鼠体重和尿 D-木糖变化评价造模成功与否[14]。停止造模后,分别取正常对照组大鼠(3 只)和模型组大鼠(3 只)进行在体空肠灌流,将剩余模型组大鼠(6 只)分为自然恢复组(3 只)和四君子汤组(3 只),并停止注射利血平,继续观察 7 天。

2.2　大鼠在体空肠灌流　在造模结束时,分别取正常对照组和模型组大鼠各 3 只,进行在体空肠灌流;在实验结束时,取正常对照组、自然恢复组、四君子汤组大鼠各 3 只,进行在体空肠灌流。乙醚麻醉,从剑突沿腹中线剪约 4 cm 长切口,打开腹腔暴露空肠,沿幽门找到十二指肠(长约 8 cm),与之相连的即为空肠,量取约 25 cm 长的空肠,近端剪一切口,插入灌流管,远端(靠近回肠)切口插管,收集灌流液,等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于打开的腹腔组织表面以保湿(注意保温)。调节蠕动泵流速为 0.33 mL/min,水浴锅中预热 Krebs-Ringer 缓冲液至 37 ℃,冲洗肠道至流出液澄清,再灌流含 75 mmol/L 葡萄糖浓度的 Krebs-Ringer 缓冲液,收集1 h灌流液。

2.3　给药方法　正常对照组和自然恢复组正常饮食,不给予中药治疗。四君子汤组根据体表面积换算,按每天 8 g/kg 灌胃,按 kg 体质量计算相当于临床用量的 15 倍[15],每天 1 次,持续 7 天。

2.4　观察项目及检测方法

2.4.1　大鼠造模前后体重变化。

2.4.2　灌流液葡萄糖含量检测　采用硫酸苯酚法。将灌流液稀释 20 倍,取各稀释液并补水至 2 mL,加入浓硫酸 5 mL,室温放置 10 min 至冷却,混匀室温放置 20 min,紫外分光光度计在波长 490 nm 波长下检测。并计算得出葡萄糖标准曲线,以计算灌流液葡萄糖含量。

2.4.3　尿 D-木糖排泄率检测　采用对溴苯胺法。将尿液稀释 50 倍,各取稀释液 0.5 mL,加入 2%对溴苯胺溶液 2.5 mL,置 70 ℃恒温水浴箱 10 min,取出室温放置 70 min,紫外分光光度计在波长 520 nm波长下检测。并计算得出 D-木糖标准曲线,以计算尿液样品浓度。尿 D-木糖排泄率(%) = 尿液样品浓度 × 尿液总体积 × 稀释倍数/(灌胃 D-木糖体积 × 灌胃 D-木糖浓度) ×100%。

2.4.4 大鼠小肠上皮细胞膜蛋白中 GLUT2 蛋白表达检测 在体空肠灌流结束后，量取一定长度经过灌流的空肠，冷的生理盐水冲洗，置于冰上刮取小肠黏膜，-80 ℃保存。首先进行总蛋白的提取，BCA 法测量蛋白浓度后，SDS-PAGE 电泳，80 V 恒压 50 min，120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止，低温条件下，100 V 恒压 60 ~ 120 min，转移电泳至 PVDF 膜，取出杂交膜，TBST 漂洗 5 min，5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 或 4 ℃过夜。TBST 洗膜5 min，3 次。一抗稀释液 4 ℃过夜或 37 ℃孵育 2 h。TBST 洗膜5 min，3 次。二抗稀释液 37 ℃孵育 1 h，TBST 洗膜 5 min，3 次。蒸馏水漂洗膜 2 min 洗 3 次。将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面，并使反应持续5 min，用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液，放至暗盒，曝光、显影。

2.4.5 GLUT2 mRNA 表达 采用荧光定量 PCR 检测。小肠黏膜样品收集同 2.3.5。提取总 RNA：用液氮研磨组织至粉末，加入 1 mL Trizol 溶液，吹打混匀，使组织充分裂解，静置 5 min；加 200 μL氯仿，震荡混匀 30 s，使水相和有机相充分接触，室温静置 2 min；4 ℃，14 000 ×g 离心 15 min，可见分为 3 层，RNA 在上层水相，移至另一个新的 RNase free EP 管；加入等体积异丙醇，轻柔地充分混匀，室温静置 10 min；4 ℃，14 000 ×g 离心 10 min，收集 RNA 沉淀，去上清；75% 乙醇洗涤两次，超净台风干；加 60 μL DEPC 水溶解沉淀。

总 RNA 纯度和完整性检测：取 1 μL RNA 样品 50 倍稀释，测定 OD 值。取 RNA 样品 1 μL，1% 琼脂糖凝胶电泳 80 V ×20 min，用凝胶成像系统观察总 RNA 的 5 s rRNA，18 s rRNA 和 28 s rRNA 条带，3 条条带完整的话即可证明总 RNA 抽提比较完整。

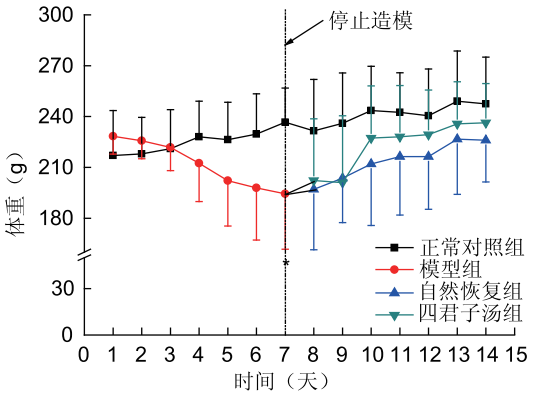
逆转录：在 RNase free 的 PCR 管中将 1.0 μg 总 RNA 用水配制成总体积为 12 μL 的溶液，吹打均匀，置 85 ℃保温 5 min，使 RNA 变性。随后立即冰上致冷，以防止 RNA 复性；在该 PCR 管中加入 Oligo (dT) 0.5 μL，Random primer 0.5 μL，10 mmol/L dNTP 2.0 μL，RNase inhibitor 0.5 μL，5x buffer 4.0 μL，M-MLV 0.5 μL，最后总体积为 8.0 μL；将上述 20 μL 反应溶液 30 ℃保温 10 min；42 ℃保温 60 min；85 ℃保温 10 min。

定量 PCR：检测序列片段大小，内参片段：β-actin-150bp；目的片段：GLUT2 -150bp。设计的引物：GLUT2-F1：5′-GCCCTCTGCTTCAGTACAT-3′，GLUT2-R1：5′-CCGGAATTCTGCAGCAATT-3′。反应体系包括：cDNA (1∶20) 5.0 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，2 ×SYBR Green qPCR SuperMix 10 μL，蒸馏水 4.0 μL，总体积为 20 μL。反应条件：预变性 50 ℃ 2 min，95 ℃ 2 min，95 ℃ 15s，60 ℃ 32 s 读板，40 循环；融解曲线分析：温度 60 ~ 95 ℃，每个样品重复 3 次。

2.5 统计学方法 所有数据用 SPSS 13.0 统计软件统计处理，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠体重变化比较(图 1) 在造模期间，与正常对照组比较，模型组大鼠体重逐步下降，在造模第 7 天结束时最低，且明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)；在第 8 天至第 14 天恢复期间，四君子汤组与自然恢复组体重逐渐恢复，各组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注：与正常对照组比较，*$P < 0.05$

图 1 各组大鼠体重变化比较

2 各组尿 D-木糖排泄率变化比较(表 1) 造模前，与正常对照组比较，模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；造模后，模型组尿 D-木糖排泄率低于正常对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；在经过自然恢复和给予四君子汤后，自然恢复组仍低于正常对照组 ($P < 0.01$)，且明显低于四君子汤组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组尿 D-木糖排泄率变化比较 (%，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿 D-木糖排泄率		
		造模前	造模后	治疗后
正常对照	6	29.39 ±14.54	31.89 ±6.42	36.41 ±1.15
模型	9	26.57 ±6.72	17.63 ±0.75 *	—
自然恢复	3	—	—	16.50 ±0.84 **
四君子汤	3	—	—	31.25 ±0.97 △

注：与正常对照组同期比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$；与自然恢复组同期比较，△$P < 0.01$

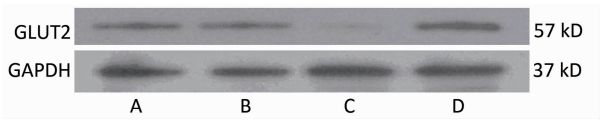
3　各组在体空肠灌流葡萄糖吸收量比较(表 2)　连续收集灌流液 60 min,模型组葡萄糖吸收量明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);在经过自然恢复和给予四君子汤 7 天后,自然恢复组仍低于正常对照组和四君子汤组,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2　各组在体空肠灌流葡萄糖吸收量比较　(mg, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	葡萄糖吸收量	
		造模后	治疗后
正常对照	3	2.64 ±0.09	2.34 ±0.03
模型	3	1.96 ±0.09*	—
自然恢复	3	—	0.96 ±0.12*
四君子汤	3	—	1.95 ±0.08△

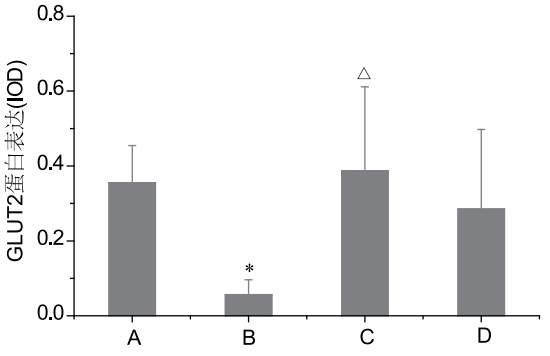
注:与正常对照组同期比较,*$P<0.05$;与自然恢复组同期比较,△$P<0.01$

4　各组 GLUT2 蛋白表达比较(图 2、3)　根据图像灰度识别,IOD 代表灰度值比值目的蛋白/内参蛋白,与正常对照组比较,模型组 GLUT2 蛋白表达明显低于正常对照组($P<0.05$);与模型组比较,四君子汤组 GLUT2 蛋白的表达明显高于模型组($P<0.05$)。



注:A 为四君子汤组;B 为正常对照组;C 为模型组;D 为自然恢复组

图 2　各组 GLUT2 蛋白电泳图



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为四君子汤组;D 为自然恢复组;与正常对照组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,△$P<0.05$;图 4 同

图 3　各组 GLUT2 蛋白表达比较

5　各组 GLUT2 mRNA 水平比较(图 4)　应用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 的分析方法进行 GLUT2 mRNA 相对表达量比较,与正常对照组比较,模型组 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$);与模型组比较,四君子汤组 mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

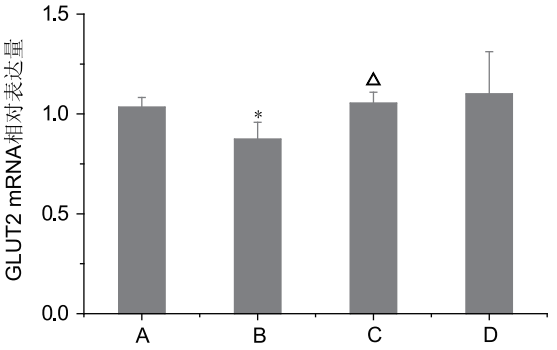


图 4　各组 GLUT2 mRNA 表达水平比较

讨　论

脾主运化水谷精微,即完成对饮食物的消化和吸收。脾气虚时则会出现一些胃肠道消化吸收功能低下及全身的表现,如腹胀便溏,怠倦乏力等症状。四君子汤具有益气健脾的功用,临床主要用于治疗脾胃气虚证,它能够改善脾虚症状。在实验研究方面,它能够改善胃肠黏膜形态,改善小肠消化、运动、吸收功能,升高脾虚动物血清 D-木糖水平,促进脾虚动物肠上皮细胞微绒毛生长,对实验性脾虚长期模型有复健作用[16]。在对 8 Gy 照射大鼠小肠移行性肌电复合波研究时,发现加味四君子汤具有调节小肠运动紊乱的作用[17]。有研究表明,利血平注射法建立脾气虚证模型,基于胃肠黏膜形态学变化,四君子汤组优于模型组和自然恢复组[18]。

应用利血平建立脾气虚证大鼠模型,观察大鼠体重变化,并结合观察尿 D-木糖排泄率变化,评价所建立的脾气虚证模型是否适合本实验需要。因为尿 D-木糖排泄率能够反应出小肠对单糖的吸收水平,模型建立之后尿 D-木糖排泄率发生明显下降,说明小肠对单糖的吸收功能降低。本实验研究主要围绕葡萄糖吸收展开,而小肠作为葡萄糖的主要吸收场所,在此病理状态下研究四君子汤对葡萄糖吸收的作用。

GLUT2 作为葡萄糖的主要转运体,在葡萄糖吸收过程中发挥重要的作用,脾气虚证存在时,其蛋白和 mRNA 的表达水平受到明显影响而下降,这直接影响了葡萄糖的吸收,导致葡萄糖吸收量下降,说明葡萄糖的吸收与 GLUT2 关系密切。经四君子汤治疗后,尿 D-木糖排泄率和葡萄糖的吸收量明显改善;在改善 GLUT2 蛋白表达方面虽高于自然恢复组,改善作用不明显,但明显高于模型组,而自然恢复组与模型组比较

无明显差异;但在改善大鼠体重、GLUT2 mRNA 表达方面作用效果不明显。由于利血平所建立的脾气虚证模型主要是因为短期的利血平不良反应所致,当停止给予注射利血平后,急性的毒副反应刺激终止。局部小肠所处的病理状态短期内仍然存在,所以尿 D-木糖排泄率和葡萄糖吸收恢复较慢,在应用四君子汤治疗之后,其能够改善小肠的病理状态,促进小肠对单糖的吸收功能恢复,且效果较明显。而大鼠整体机体状态自然恢复较快,所以大鼠体重很快恢复,四君子汤无明显效果。四君子汤在作用 GLUT2 蛋白和 mRNA 表达方面,具有改善蛋白质翻译表达功能趋势,而在短期内对 mRNA 转录功能恢复无明显影响。以此我们认为,四君子汤改善小肠葡萄糖吸收的功能,可能是通过调节 GLUT2 蛋白表达来发挥作用的。

四君子汤能够改善胃肠黏膜形态,可能通过增加和改善小肠上皮细胞的微绒毛,促进其顶端浆膜内 GLUT2 的增加,以恢复小肠葡萄糖吸收功能,从而改善了葡萄糖的吸收状态。本实验表明了四君子汤在调整胃肠道营养物质葡萄糖吸收方面,能够发挥其健脾的作用,促进了葡萄糖的吸收,四君子汤治疗脾气虚证与改善葡萄糖吸收存在一定的效应关系。因此,葡萄糖作为三大营养物质之一,其吸收状态能够反应出小肠的吸收功能的变化。四君子汤的基础研究应用,为胃肠道营养物质消化吸收功能低下患者的治疗提供了思路。

在观察大鼠一般症状表现时,大鼠饮水摄食量明显下降,但并未记录详细数据,在后续研究中可以考虑加入此指标的记录观察,以及通过病理切片和超微结构观察,评价小肠黏膜病理状态,以丰富脾气虚证时小肠客观指标的支持。本实验应用在体空肠灌流技术,研究脾气虚证模型大鼠葡萄糖吸收功能的变化情况。脾气虚证大鼠存在小肠吸收障碍,而在体空肠灌流方法是研究吸收功能的一种方法,在取样时它更多的保留了样品的生物活性,能够较为真实准确的反应出小肠吸收葡萄糖的情况,为研究脾气虚证模型小肠吸收功能的变化,以及营养物质的消化吸收提供了新的借鉴方法。

参 考 文 献

[1] 南京医学院中西医结合研究组. 脾虚泄泻证动物模型的研究[J]. 浙江中医杂志, 1982,(8): 355.

[2] 彭成,罗亮. 过食酸味所致脾虚机理的实验研究[J]. 山东中医学院学报,1989,13(6): 13 -14.

[3] 黄柄山,毛翼楷,范隆昌,等. 饮食失节所致的脾虚动物模型及中药治疗观察[J]. 中西医结合杂志,1983,3(5): 295 -296.

[4] 王淑兰,王安民,杨畔农. 马属动物驴脾气虚证的实验研究[J]. 中医杂志, 1990, 30(3): 177 -179.

[5] 谢仰洲,陈琦涛,谢宗岑,等. 用过劳和饮食失节法塑造大白鼠脾气虚证模型的研究[J]. 中医杂志,1987,27(5): 377 -380.

[6] 陈小野,武晓冬,蔡永春,等. 脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法和思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 3 -5.

[7] 北京市中医研究所,北京中医医院. 有关脾气虚实质的临床观察和实验研究[J]. 中华医学杂志,1982,62(1): 24 -26.

[8] 胡彩钦,陈祥贵,李春梅,等. 四君子汤对利血平化小鼠脑内单胺介质的影响[J]. 中医杂志, 1981, 22(11): 63.

[9] 黄树明,于宝玲,张江红. 利血平致脾虚家兔离体空肠平滑肌张力的变化及四君子汤的影响[J]. 中医药学报, 1988,(1): 46.

[10] 刘学松,黄树明,李织,等. 利血平致动物脾虚模型机制的研究[J]. 中国医药学报,1989,4(5): 68 -70.

[11] 刘璐,崔景斌,方洪壮. 替硝唑大鼠小肠吸收的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 4 -6.

[12] 陈玉龙,张海艇,李茹柳,等. 四君子汤对利血平致脾虚大鼠唾液淀粉酶分泌的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(5): 465 -467.

[13] 郭文峰,高小玲,李茹柳,等. 利血平致大鼠脾虚模型尿D-木糖排泄率与肠黏膜三磷酸腺苷水平的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2008, 16(4): 211 -214.

[14] 陈小野,吴晓冬,蔡永春,等. 脾气虚证动物模型规范的初步探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 1998, 5(12): 7 -8.

[15] 高小玲,郭文峰,李茹柳,等. 四君子汤对脾虚大鼠尿木糖排泄率及肠黏膜 ATP 的影响[J]. 中药材, 2009, 32(8): 1242 -1245.

[16] 彭成,雷载权. 四君子汤对消化、运动、吸收作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1995, (5): 6 -8.

[17] 陈国志,傅东. 加味四君子汤对 8Gy 照射大鼠小肠移行性肌电复合波的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(4): 221 -223.

[18] 姚永莉,宋于刚,赵彤,等. 大鼠脾虚证模型的胃肠黏膜形态学研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(1): 8 -10.

(收稿:2013 -03 -14 修回:2013 -06 -24)

中国中西医结合杂志