

[文章编号] 1007-3949(2011)19-12-0979-05

· 实验研究 ·

## 阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔氧化应激/炎症反应的影响

葛金文<sup>1</sup>, 刘吉勇<sup>2</sup>, 朱惠斌<sup>3</sup>, 陈懿<sup>4</sup>, 王国佐<sup>1</sup>

(湖南中医药大学 1. 中西医结合学院, 2. 基础医学院病理生理学实验室, 3. 附属第一医院检验科, 4. 基础医学院生理学教研室, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 动脉粥样硬化; 氧化应激; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 氧化型低密度脂蛋白; 血管细胞黏附分子 1; 细胞间黏附分子 1; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 通过研究氧化应激和炎症反应探讨阿托伐他汀治疗动脉粥样硬化的非调脂作用机制。方法 以高脂饲料和免疫刺激方法制备动脉粥样硬化家兔模型, 给予 0.435 mg/(kg·d) 阿托伐他汀混悬液治疗 1 个月, 观察家兔血清超氧化物歧化酶活性、丙二醛和氧化型低密度脂蛋白含量以及血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1、主动脉血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 基因和蛋白表达的变化。结果 与正常对照组比较, 动脉粥样硬化模型组家兔血清超氧化物歧化酶活性显著下降 ( $P < 0.01$ ), 血清丙二醛、氧化型低密度脂蛋白含量明显升高 ( $P < 0.01$ ); 主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1、血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 和蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 阿托伐他汀组家兔血清超氧化物歧化酶活性显著升高 ( $P < 0.01$ ), 血清丙二醛、氧化型低密度脂蛋白含量均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1、血管细胞黏附分子 1、细胞间黏附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 和蛋白表达明显下调 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 阿托伐他汀具有抗氧化应激和炎症反应的作用, 从而保护血管内膜, 发挥治疗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Atorvastatin on Oxidative Stress/Inflammatory Response in Rabbits with Atherosclerosis

GE Jin-Wen<sup>1</sup>, LIU Ji-Yong<sup>2</sup>, ZHU Hui-Bin<sup>3</sup>, CHEN Yi<sup>4</sup>, and WANG Guo-Zuo<sup>1</sup>

(1. Institute of Integrative Medicine, 2. Pathophysiology Laboratory of Basic Medicine School, 3. Biochemistry Laboratory of the First Affiliated Hospital, 4. Physiology Department of Basic Medicine School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Oxidative Stress; Superoxide Dismutase; Malondialdehyde; Oxidized Low-Density Lipoprotein; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Intercellular Adhesion Molecule-1; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To study the non-lipid mechanisms of atorvastatin treating atherosclerosis by observing the changes of oxidative stress and inflammatory response. **Methods** The rabbit model of atherosclerosis were prepared by feeding the high fat diet and immune stimulation, then 0.435 mg/(kg·d) suspension of atorvastatin was given for 1 month. It was observed for the rabbit serum superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) levels and lectin-like oxidized low density lipoprotein cholesterol receptor-1 (LOX-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and protein expression. **Results** Compared with the control group, rabbit serum SOD activity was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), serum MDA, ox-LDL was significantly higher ( $P < 0.01$ ); mRNA and protein expression of aortic LOX-1, VCAM-1, ICAM-1, and MCP-1 were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ )

[收稿日期] 2011-04-06

[基金项目] 湖南省自然科学基金重点课题(09JJ3073);长沙市科技计划重点项目(K0802106-31)

[作者简介] 葛金文, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究, E-mail 为 cmgjlw@tom.com。刘吉勇, 硕士, 助教, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究。朱惠斌, 副主任技师, 主要从事生化与分子生物学检验。

in atherosclerosis model group. Compared with model group, rabbits serum SOD activity was significantly increased ( $P < 0.01$ ), serum MDA, ox-LDL levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); mRNA and protein expression of aortic LOX-1, VCAM-1, ICAM-1, and MCP-1 were significantly lower in atorvastatin group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Atorvastatin possesses anti-oxidative stress and inflammatory response, thereby it can protect the vascular endothelium and play a therapeutic role in atherosclerosis.

氧化应激与动脉粥样硬化的发病关系密切,在动脉粥样硬化发生、发展中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。氧化应激是指机体或细胞内氧自由基的产生与消除失衡,或外源性氧化物质的过量摄入,导致活性氧(ROS)在体内或细胞内蓄积而引起的细胞毒性过程。氧化应激促进动脉粥样硬化发生发展的机制主要通过氧化作用、诱导血管基因表达,促进局部炎症反应和细胞增殖,多方面参与动脉粥样硬化的发生与发展。因此,抗氧化治疗成为这类疾病治疗的新的方向,为预防和治疗动脉粥样硬化及其相关疾病的发生发展提供了新的思路和途径。他汀类药物是目前临床上应用最为广泛的调血脂药物,已知其主要作用机制是通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶活性而实现<sup>[2]</sup>,它们是否也可通过抗氧化应激和炎症反应而发挥作用呢?本研究试图从这一角度进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 药物与试剂

阿托伐他汀钙由 Pfizer Ireland Pharmaceuticals 生产,辉瑞制药有限公司进口分装,每粒 20 mg,产品批号 95837030;牛血清白蛋白为 Roche 公司产品,规格 5 g,生产批号 20082012;卵血清白蛋白为 Sigma 公司产品,规格 5 g;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) ELISA 试剂盒为美国 A & D 公司产品;血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)抗体 sc-4504、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)抗体 sc-4511、血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)抗体 sc-32410 为 Santa Cruz Biotechnology 产品;单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)抗体 ab18678 为 Abcam 产品;HRP 标记二抗为 KPL 公司产品;小鼠 Actin 为美国 Sigma 公司产品。

### 1.2 实验动物及造模

健康日本大耳白兔 45 只,体重 1.5 ~ 2 kg,雌雄各半,购于武汉市万千佳实验动物养殖有限公司,动物合格证号 SCXK(鄂)2004-0006。饲养于湖南中医药大学动物实验中心,合格证号 SYXK(湘)2009-0001。按性别和体重将实验动物随机选取 10 只进

入空白对照组,其余参照文献 [3,4] 并改良采用高脂饲料喂养及血管内膜免疫损伤方法进行造模。高脂饲料按普通饲料 79%、胆固醇 1%、猪油 5%、蛋黄粉 15% 比例配制。造模第 1 天从兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白进行免疫刺激(25 mg/kg,1 次/周,共注射 3 次),同时用卵血清白蛋白进行皮下注射(2.5 mg/kg,两天 1 次,共 5 次),造模时间 8 周。将造模成功的大鼠随机分为模型组和阿托伐他汀组,每组 11 只。

### 1.3 给药方法

模型成功后,开始灌胃给药,每日 1 次,灌胃体积 10 mL/kg,灌胃时间 1 个月。空白对照组、模型组给予蒸馏水灌胃,阿托伐他汀组阿托伐他汀混悬液灌胃,剂量为 0.435 mg/(kg·d)。

### 1.4 血清 ox-LDL、SOD 及丙二醛的测定

夹心酶联免疫吸附法测定血清 ox-LDL 含量;用黄嘌呤氧化酶法检测总 SOD 活性;硫代巴比妥酸反应法测定血清丙二醛(MDA)含量。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.5 主动脉 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 及 LOX-1 的 mRNA 表达检测

取胸主动脉起始部 0.5 cm 用作 RT-PCR 检测。逆转录反应(RT)操作参照大连 TaKaRa 公司提供的 RT-PCR 试剂盒说明书,建立 10  $\mu$ L 反应体系,快速混匀一次,按以下条件进行 RT:30 $^{\circ}$ C 10 min;42 $^{\circ}$ C 30 min;99 $^{\circ}$ C 5 min;5 $^{\circ}$ C 5 min。RT 产物立即行 PCR 实验或保存于 -20 $^{\circ}$ C。用 Primer 5.0 软件设计 PCR 引物序列并作适当修饰,以避免引物自身的形成发夹结构及引物二聚体,引物设计后,由上海生工合成。以  $\beta$ -actin 为内参照。引物序列见表 1。

### 1.6 主动脉 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 及 LOX-1 的蛋白表达检测

取腹主动脉起始部 0.5 cm 用作 Western blot 检测。凝胶图像处理系统测定目的条带的光密度值,计算其与 Actin 光密度值的比值,即相对光密度。

### 1.7 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用  $t$  检验,多均数组比较进行方差齐性检验后采用 One-Way ANOVA 分析,两两比较采用 LSD 法。

表 1. 引物名称、序列和扩增长度

Table 1. Name, sequence and amplification length of primers

引物名称	引物序列	扩增产物长度
β-actin	上游: 5'-TCTTCCAGCCCTCTTCCTG-3'	409 bp
	下游: 5'-CGTTTCTGCGCCGTTAGGT-3'	
ICAM-1	上游: 5'-TGC GCGTCACTGTCTCA-3'	185 bp
	下游: 5'-ACGCACCTCTGGCTTCT-3'	
VCAM-1	上游: 5'-CCAACAAGGCAGAGTA-3'	191 bp
	下游: 5'-CCAACAAGGCAGAGTA-3'	
MCP-1	上游: 5'-CAGGCAGAGATCAGGAC-3'	232 bp
	下游: 5'-GAGGTTTCAAGGCAATAAG-3'	
LOX-1	上游: 5'-TTTGAAATGGCTTTGA-3'	218 bp
	下游: 5'-GCTGTTGCTTAGGAGGT-3'	

2 结果

2.1 模型评判

实验造模后第 60 天, TC、LDLC、HDLc 均显著升高, 与造模前比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), TG 变化不明显。表明实验兔高血脂症在 60 天时已经形成, 由于 TG 变化不显著, 该方法造成的高脂血症相当于临床 II a 型。肉眼观察主动脉血管壁粗糙, 可见大小不等的乳白色斑块, 以主动脉起始部最严重; 主动脉病理切片显示内膜明显增厚, 脂质斑块弥漫, 内有泡沫细胞大量积聚, 内皮下大量脂质和泡沫细胞堆积, 并可见破裂的斑块, 可见大量带核细胞和血管平滑肌细胞; 中层结构紊乱, 中膜平滑肌细胞排列紊乱, 内弹性纤维断裂, 排列紊乱, 并有炎性细胞浸润, 由此判定动脉粥样硬化模型成功 (图 1)。

2.2 血清 SOD、丙二醛及 ox-LDL 的变化

与空白对照组比较, 模型组血清丙二醛、ox-LDL 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ), SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 阿托伐他汀组血清 SOD 活性升高, 血清丙二醛、ox-LDL 含量降低 ( $P < 0.01$ ; 表 2)。

表 2. 血清 SOD、丙二醛和 ox-LDL 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The levels of SOD, MDA and ox-LDL

分 组	n	SOD (ku/L)	丙二醛 (μmol/L)	ox-LDL (μg/L)
空白对照组	6	128.95 ± 11.10	3.89 ± 1.64	95.40 ± 6.19
模型组	10	81.18 ± 14.98 <sup>a</sup>	7.48 ± 1.16 <sup>a</sup>	153.65 ± 19.64 <sup>a</sup>
阿托伐他汀组	10	121.29 ± 13.33 <sup>b</sup>	4.93 ± 0.82 <sup>b</sup>	115.15 ± 14.30 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

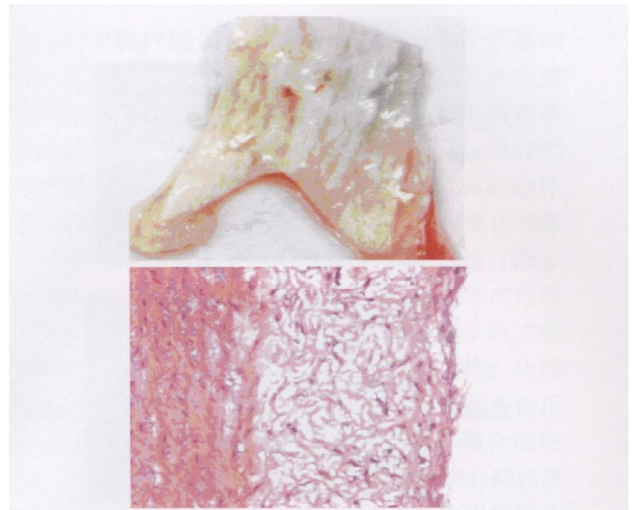


图 1. 造模后胸主动脉肉眼所见 (上) 和主动脉弓病理切片 (下, HE 染色, 400 ×)

Figure 1. Thoracic aortic observed by naked eye and aortic arch pathology of rabbit modeling

2.3 胸主动脉 LOX-1、MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 的表达变化

总 RNA 样品经电泳后可以看到明显 5S、18S 及 28S 条带, 认为符合实验要求 (图 2)。空白对照组胸主动脉基本无 LOX-1 和 MCP-1 mRNA 的表达, 模型组 LOX-1、MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 的表达与空白对照组比较显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而阿托伐他汀组 LOX-1、MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 mRNA 与模型组比较明显降低 ( $P < 0.05$ ; 表 3 和图 3)。

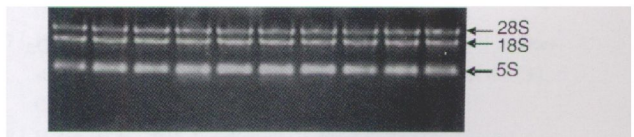


图 2. 细胞总 RNA 凝胶电泳结果

Figure 2. The gel electrophoresis result of total RNA on cells

表 3. 胸主动脉炎性因子 mRNA 表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. mRNA expression changes of inflammatory factors in thoracic aorta

指 标	空白对照组	模型组	阿托伐他汀组
LOX-1	0.09 ± 0.01	0.92 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>bc</sup>
MCP-1	0.06 ± 0.02	0.86 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>bd</sup>
ICAM-1	0.19 ± 0.04	0.66 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>bd</sup>
VCAM-1	0.17 ± 0.02	0.43 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

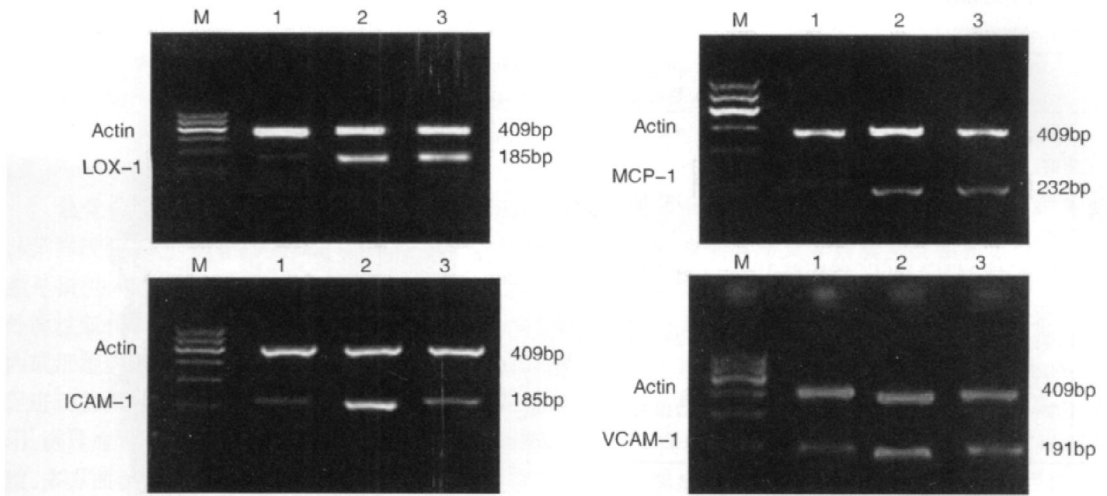


图3. 胸主动脉炎症因子 mRNA 凝胶电泳图 M 为标记物,1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阿托伐他汀组。

Figure 3. mRNA express gel electrophoresis for inflammatory factors in thoracic aorta

2.4 腹主动脉 LOX-1、MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白的表达

模型组腹主动脉 LOX-1、MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白的表达与空白对照组比较显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而阿托伐他汀组 LOX-1、MCP-1、ICAM-1 及 VCAM-1 蛋白的表达较模型组明显下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 表 4 和图 4)。

表 4. 腹主动脉炎症因子蛋白的表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4. Protein expression changes of inflammatory factors in abdominal aorta

指 标	空白对照组	模型组	阿托伐他汀组
LOX-1	0.13 ± 0.02	0.89 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>ac</sup>
MCP-1	0.11 ± 0.03	0.91 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>ad</sup>
ICAM-1	0.22 ± 0.06	0.73 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>ac</sup>
VCAM-1	0.26 ± 0.04	0.89 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>d</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

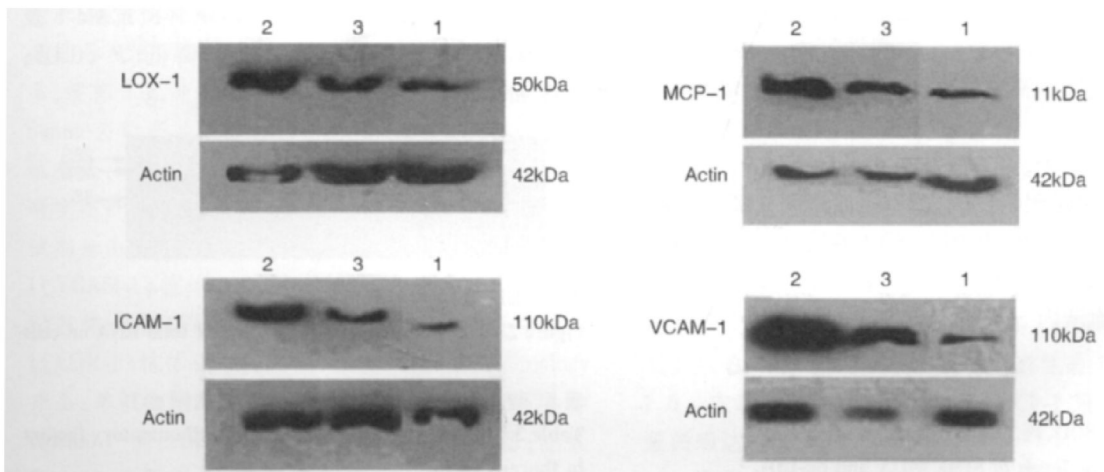


图4. 腹主动脉炎症因子蛋白的表达 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阿托伐他汀组。

Figure 4. Inflammatory factors protein expression for abdominal aorta

3 讨 论

高脂血症、糖尿病、高血压和吸烟是公认的动脉

粥样硬化发生发展的危险因素,虽然这些危险因子的致病机制并不十分清楚,但氧化应激贯穿动脉粥样硬化斑块的形成、发展及斑块破裂触发临床事件

的始终,被认为是其致动脉粥样硬化发生、发展的重要机制之一<sup>[5]</sup>。氧化应激过程中产生过量的 ROS,是动脉粥样硬化发生的一个重要促进因素,多种 ROS 在血管病理生理过程起重要作用。在机体抗氧化酶系统中,SOD 是唯一将超氧阴离子催化成相对稳定的过氧化氢的抗氧化酶,它可清除氧自由基所致的炎症损伤,阻止缺血损伤部位的氧自由基损伤,抑制体内补体激活,保护组织细胞免遭补体活化介导的炎症损伤。本研究中,在动脉粥样硬化发生时 SOD 活性明显下降,表明动脉粥样硬化发生时机体氧自由基清除能力大大减弱,氧化反应增强。

氧化应激增强导致血管壁内过多生成的 ROS 使内皮下间隙的 LDL 氧化修饰生成 ox-LDL,通过多种途径直接和间接促成动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>:包括血管内皮细胞(VEC)损伤所致的功能障碍,循环 LDL 进入内皮下间隙对单核细胞和 T 淋巴细胞的趋化作用,抑制巨噬细胞的活性使之滞留于动脉壁内,从而正反馈加强局部血管壁的炎症反应。ox-LDL 还是调节转录活化因子 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 表达的信号,从而进一步促进与炎症有关的基因产物如 VCAM-1、ICAM-1 及 MCP-1 的表达,前两者能增加单核细胞进入动脉粥样硬化处,后者则具有 T 细胞的化学趋化性,能诱导 T 细胞和巨噬细胞在动脉粥样硬化损伤处募集,从而促进病变的发展。ox-LDL 的上述作用是由其受体所介导,如 LOX-1、清道夫受体 A、清道夫受体 B 和 CD36 等<sup>[7]</sup>。LOX-1 主要表达于 VEC,负责 VEC 对 ox-LDL 结合、内吞和降解<sup>[8]</sup>。本研究结果与上述理论完全一致,当 SOD 活性下降氧化应激反应增强时,家兔 ox-LDL 显著增加,导致 LOX-1 基因和蛋白表达升高,炎症细胞因子 VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 基因和蛋白表达也显著增多,进一步高脂和免疫刺激所引起的动脉粥样硬化形成过程中,机体氧化应激和炎症反应是重要的发病机制。

至今尚无令人满意的阻止动脉粥样硬化进展的药物。他汀类是目前临床上应用最为广泛的调血脂药物<sup>[2]</sup>,其降低血浆总胆固醇和 LDL 的作用已为大量临床研究所证实。它通过抑制 HMG-CoA 还原酶,减少胆固醇的合成,并上调肝细胞表面 LDL 受体的表达,提高受体介导的血浆低密度脂蛋白的清除率,降低肝脏脂蛋白的装配与分泌,从而有效调节血脂。他汀类药物如洛伐他汀、辛伐他汀、阿托伐他汀、普伐他汀和氟伐他汀等通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶活性,减少内源性胆固醇的合成,使血浆

和组织细胞内胆固醇浓度降低,促进浓度依赖的 LDL 受体活性增高,加速 LDL 的分解代谢,并能减少极低密度脂蛋白(VLDL)的合成,使 VLDL 转化成 LDL 减少,从而进一步降低 LDLC 水平<sup>[9]</sup>。他汀类对心脑血管病的治疗作用也得益于多种非调脂作用,新近研究表明,阿托伐他汀对高脂血症氧化应激有一定的调节多用<sup>[10]</sup>。本研究中,阿托伐他汀能显著降低高脂和免疫刺激所致动脉粥样硬化形成过程中氧化应激反应,显著提高 SOD 活性,减少丙二醛和 ox-LDL 的生成以及血管壁 LOX-1 的表达,从而显著抑制 VCAM-1、ICAM-1 和 MCP-1 所致的炎症反应,保护血管内膜,抑制或减缓动脉粥样硬化的形成。已有报道环氧合酶抑制剂塞来昔布联合阿托伐他汀能减轻载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠模型动脉粥样硬化程度,降低 VCAM-1、MCP-1 等炎症细胞因子的水平<sup>[11]</sup>,然而从氧化应激和炎症反应的角度系统探讨阿托伐他汀对动脉粥样硬化的作用尚少见报道。

#### [参考文献]

- [1] Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis [J]. *Pathophysiology*, 2006, 13 (3): 129-142.
- [2] Haider DG, Baghestanian M. HMG-CoA-reductase inhibitors/statins: An improval for patients suffering from peripheral vascular disease [J]. *Aus J Cardiol*, 2004, 11 (3): 84-89.
- [3] 张均田. 现代药理实验方法学 [M]. 北京: 中国医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997; 1259.
- [4] 王园园, 龙民慧. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价 [J]. *实验动物科学*, 2008, 25 (3): 18-21.
- [5] Calderón JC, Fernández AZ, María de, et al. Atherosclerosis, oxidative stress and physical activity [J]. *Invest Clin*, 2008, 49 (3): 397-410.
- [6] Galle J. Atherosclerosis and arteritis: implications for therapy of cardiovascular disease [J]. *Herz*, 2004, 29 (1): 4-11.
- [7] Mehta JL, Sanada N, Hu CP, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet [J]. *Circ Res*, 2007, 100: 1 634-642.
- [8] Morawietz H. LOX-1 receptor as a novel target in endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2010, 135 (7): 308-312.
- [9] Blumenthal RS. Statins: effective antiatherosclerotic therapy [J]. *Am Heart*, 2000, 139 (4): 577-583.
- [10] Puccetti L, Santilli F, Pasqui AL, et al. Effects of atorvastatin and rosuvastatin on thromboxane-dependent platelet activation and oxidative stress in hypercholesterolemia [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214 (1): 122-128.
- [11] Raval M, Frank PG, Lanury-Kleintop L, et al. Celecoxib combined with atorvastatin prevents progression of atherosclerosis [J]. *J Surg Res*, 2010, 163 (2): e 113-122.

(此文编辑 文玉珊)