

◇临床研究◇

肾素抑制剂阿利吉仑对阿霉素肾病小鼠肾损伤及足细胞 nephrin 表达的影响

伍巧源^{1,2}, 廖蕴华¹, 杨桢华¹, 郭 谊³, 周颖川⁴, 陈一强⁵

(广西医科大学:1. 第一附属医院肾内科, 2. 研究生院, 3. 第一附属医院检验科, 4. 第一附属医院病理科, 5. 第一附属医院呼吸科, 广西南宁 530021)

摘要:目的 观察肾素抑制剂阿利吉仑对阿霉素肾病小鼠肾损伤的保护作用及对足细胞 nephrin 表达的影响。方法 通过尾静脉注射阿霉素建立小鼠阿霉素肾病模型后给予阿利吉仑,另设正常对照组及阿霉素肾病对照组;比较不同组别尿蛋白及肾功能的差异;肾组织石蜡切片行 PAS、HE 和 Masson 染色,观察各组肾小球硬化程度和肾小管损害程度。RT-PCR 及 Western blot 检测各组 nephrin 的表达。结果 阿霉素肾病小鼠表现为蛋白尿、低蛋白血症并伴有进行性肾功能下降,病理表现为肾小球硬化及小管间质损害;阿利吉仑可使蛋白尿状况显著改善,血清白蛋白上升,肾功能恶化得以延缓($P < 0.05$),肾小球硬化和小管间质损害程度明显改善($P < 0.05$)。阿霉素肾病小鼠 nephrin mRNA 及蛋白表达水平均显著低于正常对照组,给予阿利吉仑干预后 nephrin mRNA 及蛋白表达水平有显著上升($P < 0.05$)。结论 阿利吉仑对小鼠阿霉素肾病有良好的保护作用,该作用至少部分与其上调肾小球足细胞 nephrin 的表达有关。

关键词:肾素抑制剂;阿利吉仑;阿霉素肾病;足细胞;nephrin

中图分类号:R692 文献标志码:A 文章编号:1671-8259(2014)05-0665-04

DOI:10.7652/jdyxb201405019

Effects of renin inhibitor aliskiren on adriamycin nephropathy and nephrin expression in podocytes in mice

WU Qiao-yuan^{1,2}, LIAO Yun-hua¹, YANG Zhen-hua¹,
GUO Yi³, ZHOU Ying-Chuan⁴, CHEN Yi-qiang⁵

(1. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 2. Graduate School, Guangxi Medical University, 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 4. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 5. Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of renin inhibitor aliskiren on adriamycin nephropathy and nephrin expression in podocytes in mice. **Methods** Male BALB/c mice were subjected to a single tail vein injection of adriamycin to establish the model of adriamycin nephropathy. Then mice were treated with aliskiren; 24-hour urine samples were collected for measurement of urinary protein. Mice were sacrificed at week 6. The paraffin-embedded sections of their kidneys were stained by PAS, Masson and HE staining. The expressions of nephrin mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blot. **Results** Adriamycin nephropathy in mice was characterized by proteinuria, increased serum creatinine, progressive glomerulosclerosis, and tubulointerstitial lesions. Aliskiren could lessen proteinuria and serum creatinine significantly and alleviate the above histologic lesions significantly ($P < 0.05$). Mice with only adriamycin nephropathy showed a significant decrease of nephrin mRNA and protein expressions. Yet, Aliskiren could improve the decreased expression of nephrin mRNA and protein induced by adriamycin ($P < 0.05$). **Conclusion** Renin inhibitor aliskiren can protect against adriamycin nephropathy in mice, which may be partly related to its upregulating the expression of nephrin in podocytes.

KEY WORDS: renin inhibitor; aliskiren; adriamycin nephropathy; podocyte; nephrin

收稿日期:2013-12-26 修回日期:2014-03-20

基金项目:广西自然科学基金资助项目(No. 2010GXNSFA013183)

Supported by Guangxi Natural Science Foundation (No. 2010GXNSFA013183)

通讯作者:廖蕴华,教授。E-mail: yunhualiao1008@aliyun.com

作者简介:伍巧源(1973-),女(壮族),副主任医师,博士学位,硕士生导师。研究方向:肾小球疾病。E-mail: 236071507@qq.com

网络出版时间:2014-07-22 16:22 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1399.R.20140728.1737.001.html>

<http://www.jdyxb.cn>; <http://yxxb.xjtu.edu.cn>

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)过度激活是肾脏疾病发生发展的重要机制之一,抑制RAS系统是治疗肾脏病的有效途径。但是由于RAS系统的负反馈调节机制,应用血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)或血管紧张素受体阻断剂(angiotensin receptor blocker, ARB)会使体内肾素和血管紧张素(angiotensin, Ang II)代偿性增加,这种对RAS的不完全阻断作用限制了ACEI或ARB的肾脏保护作用。阿利吉仑是新型肾素抑制剂,可阻断RAS的初始步骤,使Ang I、Ang II水平明显减低,能更彻底地阻断RAS系统;很多研究已经表明该药在保护肾脏方面有其独特的优势。但目前研究主要集中于阿利吉仑对糖尿病肾病的保护作用^[1]。本文通过建立小鼠阿霉素肾病模型,观察阿利吉仑对该模型尿蛋白及肾脏病理改变的影响,及对足细胞neph- rin表达的影响。

1 材料与方法

1.1 小鼠阿霉素肾病模型的建立、分组与取材 18只8周龄、雄性BALB/c小鼠分为3组:分别为正常对照组、阿霉素组及阿霉素+阿利吉仑治疗组(后2组均一次性尾静脉注射阿霉素(10 mg/kg)建立小鼠阿霉素肾病模型;之后阿霉素+阿利吉仑治疗组给予阿利吉仑[3 mg/(kg·d),瑞士诺华制药有限公司]灌胃。正常对照组一次性尾静脉注射等量生理盐水。

阿霉素注射后第6周所有小鼠行24 h尿蛋白定量测定;心脏穿刺取血标本,测血清血肌酐、总蛋白、白蛋白和胆固醇。随后处死小鼠。部分肾组织以100 mL/L甲醛固定,石蜡包埋;其余肾组织液氮冷冻,-80℃保存备用。

1.2 肾脏组织学常规检查 肾组织石蜡切片行PAS、HE和Masson染色,观察肾组织肾小球硬化程度和肾小管损害程度。肾小球硬化定义为在一毛细血管襻节段内出现PAS染色阳性物质引起的系膜区扩张、球囊粘连和毛细血管襻塌陷。肾小球硬化程度按0~4分的半定量计分方法评价:无硬化改变为0分;硬化占整个肾小球面积的25%以下为1分;占整个肾小球面积的26%~50%为2分;占整个肾小球面积的51%~75%为3分;占整个肾小球面积的76%~100%为4分。每只小鼠肾小球硬化的最终评分为所评价的小鼠所有肾小球计分的平均值。每只小鼠至少评价30个肾小球,结果表示为均数±标准

误,评分采用盲法。肾小管间质的损伤定义为近端小管刷状缘消失、肾小管扩张、萎缩以及间质纤维化形成,按程度以0~4分的半定量计分方法评价:正常为0分;小管间质损害<25% 1分;小管间质损害25%~50%为2分;小管间质损害51%~75% 3分;小管间质损害>75%为4分。每只小鼠至少评价30个连续非重叠的皮质区高倍镜下视野(×400),最终评分由所有高倍镜下视野计分的平均值得出,结果表示为均数±标准误,评分采用盲法。

1.3 RT-PCR检测肾组织neph- rin mRNA的表达

Trizol法提取肾皮质总RNA,取2 μg RNA进行逆转录合成cDNA。neph- rin正义引物、反义引物序列分别为5'-GGGGACCCCTCTATGATGAA-3'、5'-GTGAAGCGTCTCACACCAGA-3',产物为171 bp。GAPDH正义引物、反义引物序列分别为5'-CTAC-CCCCAATGTGTCCGTC-3'、5'-AGCCCAAGATG-CCCTRCAGT-3',产物为120 bp。经15 g/L琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统(Alpha Innotech, USA)分析检测电泳图像吸光度值,以neph- rin和内参照GAPDH的吸光度之比作为检测指标的相对表达量。

1.4 免疫印迹测定足细胞neph- rin的表达 用含10 g/L蛋白酶抑制剂的PLC细胞裂解液提取肾组织总蛋白,Bradford法进行蛋白定量后,50 μg上样于100 g/L SDS分离胶电泳,转膜后用含50 g/L脱脂奶粉的TBST室温封闭1 h,加相应一抗(Abcam公司,1:500稀释)于4℃培育过夜后,辣根过氧化物酶耦联的二抗室温培育1 h;与ECL显色剂反应1 min,曝光显影。结果应用凝胶成像系统(Alpha Innotech, USA)分析;以GAPDH为内参照,所检测蛋白与之比值的比值作为该蛋白表达的相对值。

1.5 统计学分析 计量资料以均数±标准差表示。组间均数比较采用SPSS 17.0统计学软件行方差(ANOVA)分析。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠尿与血生化指标的检测结果 相比于正常对照组,单纯给予阿霉素后小鼠出现明显的蛋白尿、低蛋白血症、高胆固醇血症并伴有进行性肾功能下降;但阿霉素注射后再给予阿利吉仑则小鼠上述情况总体得到明显改善;尿蛋白减少,血清白蛋白上升,血清肌酐则明显下降;但对胆固醇的影响则不明显(表1)。

表 1 各组小鼠蛋白尿与血生化指标的比较

Tab. 1 Comparison of proteinuria and blood biochemistry among all groups

组别	尿蛋白(mg/24 h)	白蛋白(g/L)	胆固醇(mmol/L)	肌酐(μ mol/L)
正常对照组	0.55 \pm 0.15	51.90 \pm 3.58	2.70 \pm 0.28	37.58 \pm 1.18
阿霉素组	2.21 \pm 0.38 [#]	29.56 \pm 4.83 [#]	4.95 \pm 0.33 [#]	63.59 \pm 3.50 [#]
阿霉素+阿利吉仑组	1.18 \pm 0.21 [*]	41.12 \pm 4.22 [*]	4.53 \pm 0.45	49.27 \pm 2.76 [*]

与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与阿霉素组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 各组小鼠肾脏组织学的病理改变 与正常对照组比较, 单纯注射阿霉素 6 周后小鼠肾脏组织学改变包括进展性局灶节段肾小球硬化、肾间质广泛纤维化和肾小管萎缩。而阿利吉仑可显著改善阿霉素导致的上述病理改变($P < 0.05$, 表 2, 图 1)。

2.3 各组肾组织足细胞 nephrin mRNA 及蛋白表达 单纯阿霉素肾病小鼠 nephrin mRNA 的水平较正常对照组明显下降($P < 0.05$), 但给予阿利吉仑干预后 nephrin mRNA 表达显著回升($P < 0.05$)。肾组织

nephrin 蛋白表达亦具有类似的变化趋势(图 2、图 3)。

表 2 阿利吉仑对阿霉素肾病小鼠肾组织病理损害的影响

Tab. 2 Effects of aliskiren on renal histology of mice with adriamycin nephropathy

组别	肾小球硬化半定量评分	肾小管间质损伤半定量评分
正常对照组	0.01 \pm 0.001	0.01 \pm 0.001
阿霉素组	0.80 \pm 0.21 [#]	1.65 \pm 0.17 [#]
阿霉素+阿利吉仑组	0.39 \pm 0.15 [*]	0.61 \pm 0.05 [*]

与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与阿霉素组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

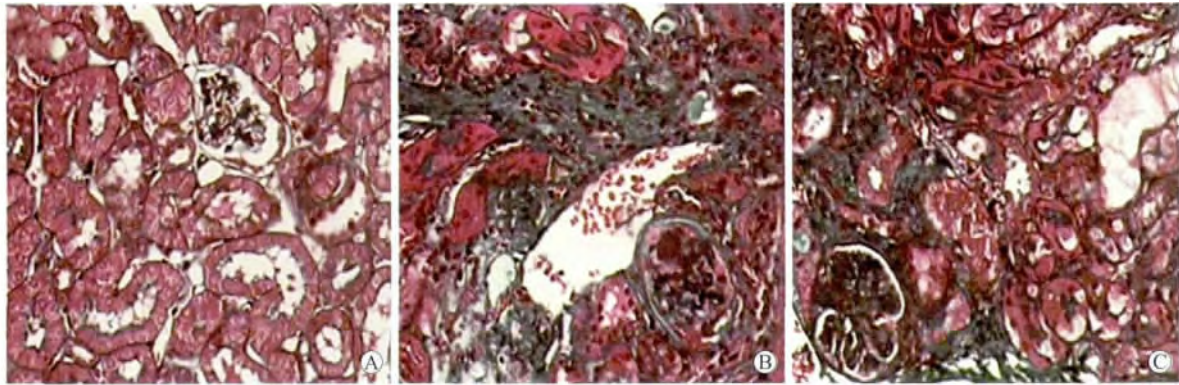


图 1 阿利吉仑对阿霉素肾病小鼠肾脏病理损害的影响

Fig. 1 Effects of aliskiren on renal histology of mice with adriamycin nephropathy (Masson staining, $\times 200$)

A: 正常对照组; B: 阿霉素组; C: 阿霉素+阿利吉仑治疗组。

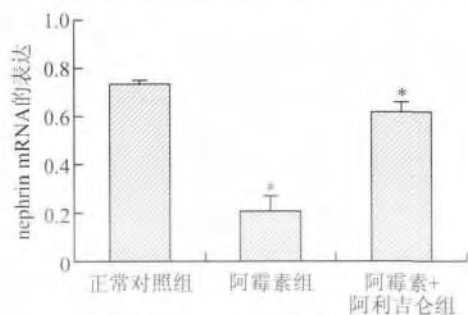
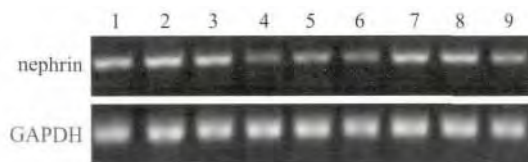


图 2 各组 nephrin mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of nephrin mRNA in each group

1~3: 正常对照组; 4~6: 阿霉素组; 7~9: 阿霉素+阿利吉仑组。

与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与阿霉素组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

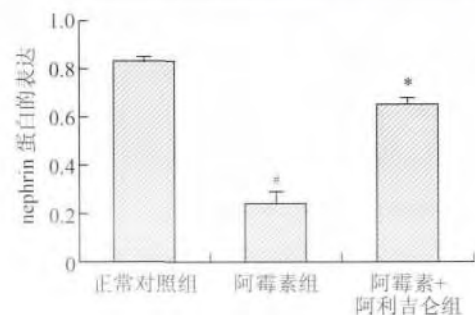
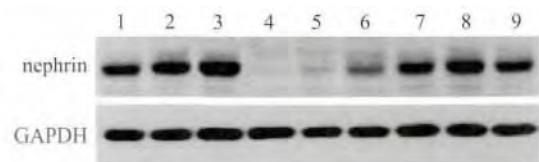


图 3 各组肾组织 nephrin 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of nephrin protein in each group

1~3: 正常对照组; 4~6: 阿霉素组; 7~9: 阿霉素+阿利吉仑组。

与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与阿霉素组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨 论

大量研究已经证实 RAS 系统阻断剂可延缓慢性肾脏病的进展,如 COOPERATE^[2] 及 RENAAL 等^[3] 研究已证实 ACEI 或 ARB 类药物能延缓慢性肾脏病的进展。但目前常用的 RAS 抑制剂有其不足之处:长期应用 ACEI 可导致“血管紧张素 II 逃逸”现象;ARB 类药物则可导致血管紧张素 II 型受体(AT2)的激活,AT2 的过度激活能导致心脏肥大和血管纤维化等不良后果。且 ACEI 和 ARB 均可升高血浆肾素活性,血浆肾素活性升高是导致高血压患者心梗的危险因素,还与肾功能不全密切相关。直接肾素抑制剂阿利吉仑可阻断 RAS 系统首步反应的限速酶,可更彻底的抑制 RAS 系统,避免血管紧张素 II 逃逸现象,不会激活任何亚型的血管紧张素受体。基于阿利吉仑的上述特点,自该药面世以来,其对肾脏的保护作用即被密切关注。但该药与肾脏病的关系研究目前主要集中于糖尿病继发肾损害。研究发现其可减少糖尿病肾病的蛋白尿,延缓肾小球硬化进展;且有报道其抑制间质纤维化的作用要强于 ACEI^[4-6]。本研究利用小鼠阿霉素肾病模型观察阿利吉仑的肾脏保护作用,结果显示小鼠阿霉素肾病模型类似于人类的局灶节段性肾小球硬化;病理学特征性表现为进展性肾小球硬化及小管间质损害等^[7],是研究人类肾小球疾病的重要模型之一。本实验给予阿霉素注射 6 周后小鼠表现出以蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和肾功能损害为特征的阿霉素肾病;病理显示阿霉素导致小鼠出现进展性肾小球硬化和肾小管间质损害。相比于单纯给予阿霉素,给予阿霉素后再给予阿利吉仑干预,尿蛋白则显著改善,血清白蛋白上升,明显延缓了肾功能恶化;并可较为明显地减轻肾小球硬化和肾小管间质损害;提示阿利吉仑对阿霉素肾损害有良好的保护作用。

RAS 系统阻断剂延缓慢性肾脏病的进展一方面是通过改善肾小球血流动力学;另一方面,除已经证实的通过抑制促细胞外基质合成因子及抑制抗细胞外基质降解因子而抑制间质纤维化,还包括介导和参与足细胞的保护作用。足细胞具有 Ang II 的 1 型受体(ATR1)^[8],并在应激时表达上调^[9];由 AT1 受体传递的强化信号可导致足细胞损伤,蛋白漏出,激活相关化学因子和细胞因子,最终引起间质纤维化和肾功能的丧失。因此,作者进一步对阿利吉仑降低蛋白尿,改善肾组织损害等肾脏保护作用是否与足细胞相关进行研究。nephrin 是足细胞分泌产生的对维持足突结构及裂孔膜的完整性具有重要作用的蛋白,

nephrin 表达减少,将影响肾小球滤过膜的完整性,导致蛋白尿的产生。本研究发现注射阿霉素后小鼠肾组织 nephrin mRNA 及蛋白表达均显著减少,而给予阿利吉仑干预后,阿霉素导致的小鼠 nephrin mRNA 及蛋白表达下调的现象得到明显改善。提示阿利吉仑可以上调 nephrin mRNA 及蛋白表达,起到修复足细胞损伤的作用,从而维持足细胞正常功能。新近亦已有少量研究提示阿利吉仑对足细胞有保护作用:如 PHILLIPS^[10] 发现阿利吉仑可下调高糖环境下小鼠足细胞的凋亡;RASHIKH^[11] 应用电镜观察阿霉素肾病大鼠肾小球超微结构发现,阿霉素可导致足细胞足突基部宽度增加以及足细胞裂孔直径减小,而阿利吉仑可明显改善阿霉素导致的足突基部增宽及裂孔直径减小。还有报道发现阿利吉仑可改善转肾素基因大鼠蛋白尿的同时,亦可上调其足细胞 podocin 的表达^[12]。这些均提示阿利吉仑对阿霉素导致的小鼠肾损害具有保护作用,可能部分与其对足细胞的保护作用相关。

参考文献:

- [1] 韩蕊,叶志斌. 直接肾素抑制剂(DRI)阿利吉仑在慢性肾脏病(CKD)中的应用进展[J]. 复旦学报:医学版, 2012, 39(4):422-427.
- [2] NAKAO N, YOSHIMURA A, MORITA H, et al. Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2003, 361(9352):117-124.
- [3] BRENNER BM, COOPER ME, DE ZEEUW D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy[J]. N Engl J Med, 2001, 345(12):861-869.
- [4] KELLYD J, ZHANG Y, MOE G, et al. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats[J]. Diabetologia, 2007, 50(11):2398-2404.
- [5] PARVING HH, PERSSON F, LEWIS JB, et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy[J]. N Engl J Med, 2008, 358(23):2433-2446.
- [6] PERSSON F, ROSSING P, REINHARD H, et al. Renal effects of aliskiren compared to and in combination with irbesartan in patients with type 2 diabetes, hypertension and albuminuria[J]. Diabetes Care, 2009, 32(10):1873-1879.
- [7] WANG Y, WANG YP, TAY YC, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events[J]. Kidney Int, 2000, 58(4):1797-1804.
- [8] SHARMA M, SHARMA R, GREENE AS, et al. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells[J]. Am J Physiol, 1998, 274(3 Pt 2):623-627.

(下转第 713 页)

: GCB = 3 : 1, non-GCB 型更常见;二者发病年龄无显著差异,男女比例无显著差异,说明本研究中 GCB 型与 non-GCB 型有很好的可比性;在 GCB 型中原发于淋巴结外占 64.3%,而 non-GCB 型原发于淋巴结外占 52.4%,二者差异无统计学意义;GCB 型中原发于胃肠道占 35.7%,non-GCB 型原发于胃肠道占 19.8%,GCB 型中原发于胃肠道明显高于 non-GCB 型,差异有统计学意义;一般胃肠道的淋巴瘤预后较其他部位好。本研究结果显示,GCB 型中原发于胃肠道明显高于 non-GCB 型^[6],这可能是 GCB 型预后好于 non-GCB 型的原因之一。有报道显示,Ki67 高表达水平是影响 DLBCL 患者的独立预后因素,LDH 水平、Ann Arbor 分期、IPI 评分为独立预后因素^[7],本研究结果显示,GCB 型 Ki67 水平($\geq 80\%$)、IPI 评分(3-5)均低于 non-GCB 型,间接提示 GCB 型预后可能会好于 non-GCB 型,与已有研究结果一致^[4-5];有研究指出,年龄大于 60 岁患者长期生存率低^[5],而本研究显示年龄段在 60 岁以上(包括 60 岁),non-GCB 型和 GCB 型发病人数无显著性差异。进一步继续随访这些病例的治疗效果、总生存期,将能更准确地评估 GCB 型和 non-GCB 型预后的差别。

参考文献:

- [1] The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma[J]. *Blood*, 1997, 89(11): 3909-3918.
- [2] ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling[J]. *Nature*, 2000, 403(6769):503-511.
- [3] ROSENWALD A, WRIGHT G, CHAN WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(25):1937-1947.
- [4] HANS CP, WEISENBURGER DD, GREINER TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray [J]. *Blood*, 2004, 103(1):275-282.
- [5] 青晓燕,姚文秀,徐义全,等. 原发于节外弥漫大 B 细胞淋巴瘤的免疫分型及其预后的关系[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(17): 5073-5078.
- [6] 陈燕,崔自强,王华,等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤 83 例预后相关因素分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(8):844-854.
- [7] 周颖,赵瑜,薄剑,等. Ki-67 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(5):1162-1166.

(编辑 国荣)

(上接第 668 页)

- [9] DURVASULA RV, PETERMANN AT, HIROMURA K, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(1):30-39.
- [10] PHILLIPS LM, WANG Y, DAI T, et al. The renin inhibitor aliskiren attenuates high-glucose induced extracellular matrix synthesis and prevents apoptosis in cultured podocytes [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2011, 118(3):49-59.
- [11] RASHIKH A, PILLAI KK, AHMAD SJ, et al. Aliskiren alle-

viates doxorubicin-induced nephrotoxicity by inhibiting oxidative stress and podocyte injury[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2013, 14(1):14-22.

- [12] WHALEY-CONNELL AI, HABIBI J, NISTALA R, et al. Combination of direct renin inhibition with angiotensin type 1 receptor blockade improves aldosterone but does not improve kidney injury in the transgenic Ren2 rat[J]. *Regul Pept*, 2012, 176(1-3):36-44.

(编辑 国荣)

(上接第 673 页)

- [12] KALINSKI P, GIERMASZ A, NAKAMURA Y, et al. Helper role of NK cells during the induction of anticancer responses by dendritic cells[J]. *Mol Immunol*, 2005, 42:535-539.
- [13] DING Y, WHITE PF. Comparative effects of ketorolac, dezocine, and fentanyl as adjuvants during outpatient anesthesia[J]. *Anesth Analg*, 1992, 75(4): 566-571.
- [14] MCCARTHY L, WETZEL M, SLIKER JK, et al. Opioids, opioid receptors, and the immune response[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2001, 62:111-123.

- [15] SACERDOTE P. Opioids and the immune system[J]. *Palliat Med*, 2006, 20:S9-S15.

- [16] DELOGU G, MORETTI S, ANTONUCEI A, et al. Apoptogenic effect of fentanyl on freshly isolated peripheral blood lymphocytes[J]. *J Trauma*, 2004, 57:75-81.

- [17] BEILIN B, SHAVIT Y, HART J, et al. Effects of anesthesia based on large versus small doses of fentanyl on natural killer cell cytotoxicity in the perioperative period[J]. *Anesth Analg*, 1996, 82:492-497.

(编辑 卓选鹏)