

清肝活血方对乙醇性肝纤维化大鼠肝星形细胞和肝细胞凋亡的影响

王磊, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光

■背景资料

酒精性肝纤维化是酒精性肝硬化的前期, 消除肝纤维化将成功阻断肝硬化的发生。星状细胞(HSC)的活化增殖, 被公认为纤维化发生的关键因素, 而通过诱导其凋亡的方式来消除纤维化, 已成为治疗纤维化的靶点之一。目前现代医学对肝纤维化的治疗尚缺少有效药物, 而中医药的良好疗效已为人所共识, 本文就是以HSC和肝细胞凋亡为对象, 来研究中药在防止酒精性肝病的相关作用机制。

王磊, 柳涛, 邢练军, 季光, 上海中医药大学附属龙华医院脂肪肝研究室 上海市 200032

郑培永, 上海中医药大学附属龙华医院临床评价中心 上海市 200032

王磊, 上海中医药大学硕士, 主要从事中医药防治肝脏疾病的研究。

上海市科委启明星跟踪计划项目, No. 03QMH1410

通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院脂肪肝研究室. jiliver@vip.sina.com

收稿日期: 2006-06-21 接受日期: 2006-07-31

Effect of Qinggan Huoxue recipe on apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes in rats with alcoholic liver fibrosis

Lei Wang, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Lian-Jun Xing, Guang Ji

Lei Wang, Tao Liu, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Laboratory of Liver Steatosis, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Pei-Yong Zheng, Clinic Evaluation Center, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by the Rising-Star Program of Shanghai Science Committee, No. 03QMH1410

Correspondence to: Dr. Guang Ji, Laboratory of Liver Steatosis, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2006-06-21 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To evaluate the influences of Qinggan Huoxue recipe (QHR) on the apoptosis of hepatic stellate cells (HSC) and hepatocytes in alcoholic liver fibrosis rats.

METHODS: Rat model of alcoholic liver fibrosis were established mainly through alcohol, and then the rats were divided into 6 groups: QHR groups [low dose: 4.75 g/(kg·d), moderate dose: 14.25 g/(kg·d), high dose: 28.5 g/(kg·d)] and control groups (normal, model, and Essentiale control). Colorimetry was used to detect the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) and gamma-

glutamyltranspeptidase (γ -GT). The degrees of inflammation and fibrosis were evaluated by HE and Masson stainings. TUNEL and TUNEL- α -SMA methods were used to detect the apoptosis of HSC and hepatocytes, respectively.

RESULTS: As compared with those in model control group, the serum levels of ALT (1213 ± 245 , 1432 ± 253 nkat/L vs 2140 ± 428 nkat/L, both $P < 0.05$), AST (1671 ± 400 , 2123 ± 413 nkat/L vs 4454 ± 850 nkat/L, both $P < 0.05$), and γ -GT (4539 ± 1847 , 5509 ± 2430 nkat/L vs 8271 ± 3304 nkat/L, both $P < 0.05$) were significantly decreased in QHR (high dose) group and Essentiale control group; the apoptosis rates of hepatocytes were reduced ($0.43\% \pm 0.11\%$, $0.60\% \pm 0.16\%$ vs $1.77\% \pm 0.49\%$, both $P < 0.05$) and the apoptosis rates of HSC were increased ($5.25\% \pm 2.48\%$, $3.63\% \pm 2.04\%$ vs $2.30\% \pm 1.24\%$, both $P < 0.05$); the degrees of inflammation and fibrosis were relieved too (5.5 ± 2.50 , 6.30 ± 3.16 vs 9.00 ± 2.27 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Chinese medicine QHR can relieve alcohol-induced fibrosis, decrease apoptosis of hepatocytes and increase apoptosis of HSC.

Key Words: Qinggan Huoxue recipe; Alcoholic liver fibrosis; Hepatic stellate cell; Apoptosis

Wang L, Liu T, Zheng PY, Xing LJ, Ji G. Effect of Qinggan Huoxue recipe on apoptosis of hepatic stellate cells and hepatocytes in rats with alcoholic liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2590-2595

摘要

目的: 观察酒精性肝纤维化大鼠Hsc和肝细胞的凋亡及中药清肝活血方对细胞凋亡的影响。

方法: 以乙醇为主制备酒精性肝纤维化大鼠模型, 将造模大鼠分为清肝活血方低(4.75 g/kg)、中(14.25 g/kg)和高剂量组(28.5 g/kg), 每日进行ig药物干预2 wk, 并设空白对照组、模型对照组及易善复对照组。比色法检测血清

ALT, AST, γ -GT; HE和Masson染色观察肝组织炎症和纤维化程度. TUNEL检测肝细胞凋亡, TUNEL- α -SMA双标记检测HSC凋亡.

结果: 清肝活血方用药组及易善复组能降低大鼠血清ALT(1213 ± 245 , 1432 ± 253 nkat/L vs 2140 ± 428 nkat/L, P 均 <0.05), AST(1671 ± 400 , 2123 ± 413 vs 4454 ± 850 nkat/L, P 均 <0.05), γ -GT水平(4539 ± 1847 , 5509 ± 2430 vs 8271 ± 3304 nkat/L, P 均 <0.05), 减轻纤维化程度(5.5 ± 2.50 , 6.30 ± 3.16 vs 9.00 ± 2.27 , $P<0.05$); 诱导活化的HSC凋亡($5.25\% \pm 2.48\%$, $3.63\% \pm 2.04\%$ vs $2.30\% \pm 1.24\%$, $P<0.05$), 减少肝细胞凋亡($0.43\% \pm 0.11\%$, $0.60\% \pm 0.16\%$ vs $1.77\% \pm 0.49\%$, $P<0.05$).

结论: 清肝活血方能有效减轻大鼠肝纤维化程度, 并减少乙醇引起的肝细胞凋亡, 诱导活化的HSC凋亡.

关键词: 清肝活血方; 酒精性肝纤维化; 肝星状细胞; 凋亡

王磊, 柳涛, 郑培永, 刑练军, 季光. 清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠肝星形细胞及肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2590-2595
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2590.asp>

0 引言

肝星状细胞(HSC)的活化增殖在酒精性肝纤维化的发生过程中发挥着重要作用, 近年来随着对细胞凋亡研究的深入, 人们发现通过诱导活化HSC凋亡可逆转肝纤维化的发生. 因此, 在前期良好的临床及药效学研究基础上, 从细胞凋亡的角度探讨中药清肝活血方治疗酒精性肝纤维化的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠72只, SPF级, 体质量 140 ± 30 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于上海中医药大学附属龙华医院实验中心动物房. CCl_4 分析纯、橄榄油化学纯、多聚甲醛化学纯(国药集团化学试剂有限公司); 吡唑(Fluca公司); 玉米油(营口渤海油脂工业有限公司); 盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司); ALT, AST, γ -GT检测试剂盒(南京建成生物公司); HE, Masson染液(上海虹桥乐翔医用试剂有限公司); Cell death detection Kit (Roche Diagnostics Ltd); α -SMA一抗BM0002, SABC试

剂盒SA1021, DAB显色液AR1022(博士德生物有限公司货号); 易善复(北京安万特制药有限公司); 清肝活血方(柴胡9 g, 黄芩9 g, 丹参15 g, 鳖甲9 g, 葛根15 g)由上海中医药大学附属龙华医院制剂室制备.

1.2 方法 模型制备采用60度二锅头酒(10 mL/kg)、玉米油(2 mL/kg)、吡唑(25 mg/kg)混合物每日早晚灌胃10 mL/kg. 第二周开始 CCl_4 橄榄油溶液(CCl_4 : 橄榄油 = 1:3) 0.3 mL/kg ip 2次/周, 空白组以等量生理盐水代替, 共10 wk^[1]. 第11周将造模组大鼠分为清肝活血方低(4.75 g)、中(14.25 g)和高剂量组(28.5 g/kg)及易善复对照组(66.5 mg/kg), 每日灌胃, 空白对照组和模型对照组以等量生理盐水代替, 给药2 wk. 血清ALT, AST, γ -GT检测采用尤尼克UV-2102C分光光度计严格按说明书步骤检测. 肝组织HE染色观察炎症坏死, Masson染色观察纤维化程度. 炎症、纤维化分级、评分标准参照文献[2-3].

1.2.1 肝细胞凋亡TUNEL检测 石蜡切片常规脱蜡至水; 双蒸水浸泡5 min, 滴加蛋白酶K(20 mg/L) 37°C, 30 min, PBS洗; 将enzyme solution I 5 μL 与II 45 μL 混合, 每片加此混合物50 μL , 湿盒内孵育60 min, PBS洗; 滴加TUNEL reaction mixture 50 μL 37°C, 1 h, PBS洗; DAB显色; 苏木素轻度复染封片. 阳性结果判定: 每组随机选片5张, 由第3人读片, 以肝细胞为计数对象不考虑其他间质细胞, 其中胞质黄染、胞核固缩变形为阳性细胞, 每片随机取中央及四周5个不同高倍镜视野(400倍)观察, 以平均每100个肝细胞核中含凋亡肝细胞个数作为肝细胞凋亡指数.

1.2.2 HSC凋亡TUNEL- α -SMA双标记检测^[4] 石蜡切片常规脱蜡至水; 0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液微波修复3 min冷却后PBS洗; 30 mL/L H_2O_2 室温孵育5-10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min; 将enzyme solution I 5 μL 与II 45 μL 混合, 每片加此混合物50 μL , 湿盒内孵育60 min, PBS洗, 5 min \times 3次; 滴加TUNEL reaction mixture 50 μL 37°C, 1 h, PBS洗; DAB显色. PBS洗, 5 min \times 3次, 50 g/L BSA封闭液室温孵育30 min; 倾去血清; 滴加稀释的一抗(1:150), 37°C 1.5 h, PBS冲洗; 滴二抗, 37°C孵育30 min, PBS洗; 滴加试剂SABC, 37°C, 30 min, PBS洗; DAB显色, 苏木素轻度复染封片. 阳性结果判定: 每组随机选片5张, 由第3人读片, 以 α -SMA表达阳性细胞为计数对象, 其中胞质黄染, 胞核棕黑色固缩、变形, 为凋亡的HSC, 每片随机取5个不同高倍镜视野

■创新盘点

本文通过双染技术对星状细胞的凋亡进行体内研究, 比体外培养更客观更真实的说明了中医中药作用靶点.

■同行评价

本文在整体实验的基础上,研究清肝活血方对酒精性肝纤维化大鼠肝HSC的凋亡的影响。研究内容新颖重要,实验设计科学合理,指标先进,统计方法恰当。

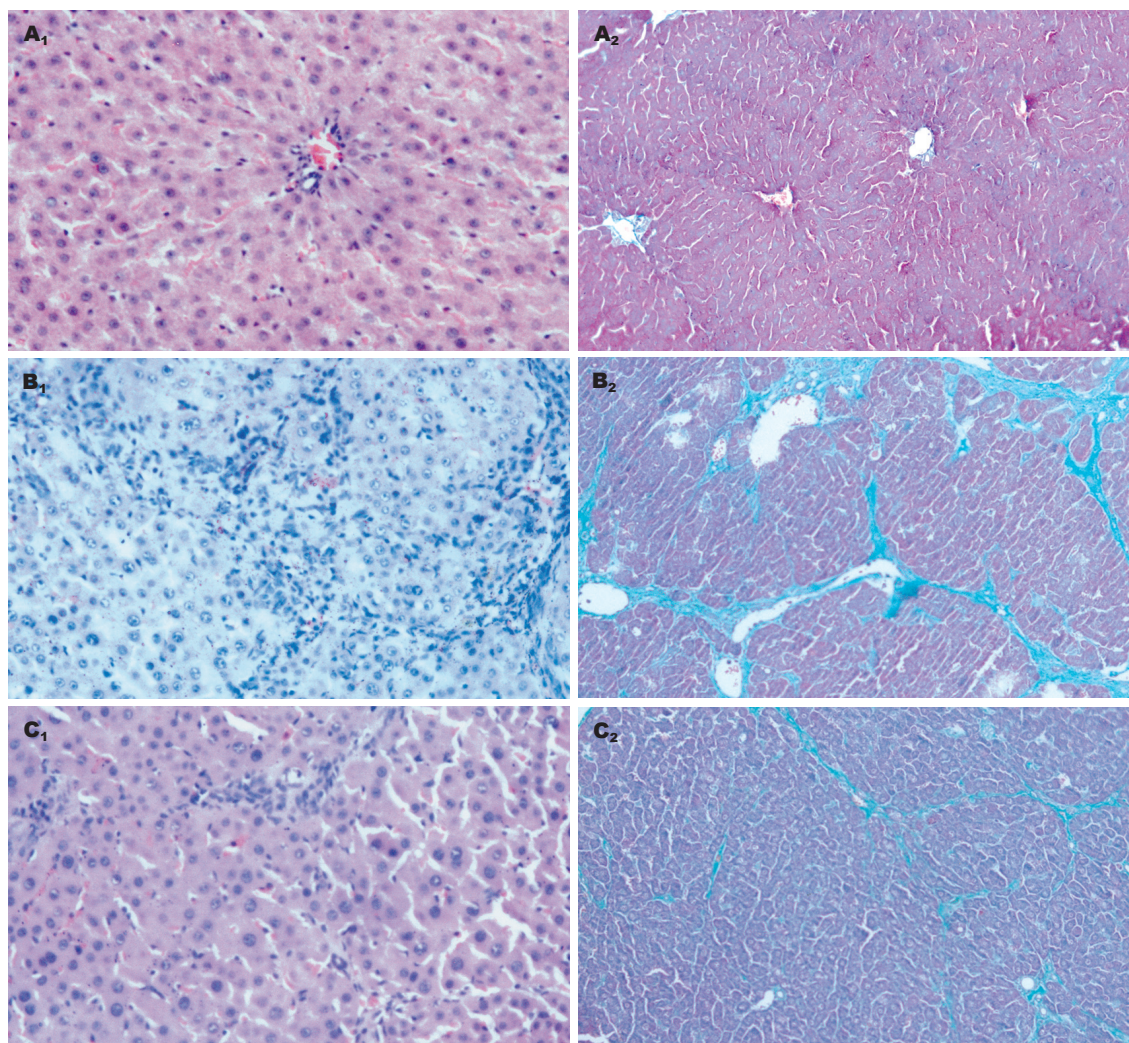


图1 乙醇引起的大鼠肝组织. A: 空白组; B: 模型组; C: 治疗组(A₁-C₁: HE × 400; A₂-C₂: Masson × 200).

(400倍)观察,以平均每100个HSC中含凋亡细胞个数作为星状细胞凋亡指数(AI).

统计学处理 各组计量资料以mean±SD表示,组间差异比较采用ANOVA and post hoc test.全部数据采用SPSS 11.5软件进行分析, $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

空白组大鼠毛发光泽,体质量增加,体态活泼,食量及大便正常.模型组大鼠饮食逐渐减少,体质量下降,大便干燥,小便黄,皮毛疏松无光泽,精神不振.易善复对照及中药各剂量组大鼠上述症状有不同程度减轻,特别是中药各组能明显改善大便干燥,小便黄的情况.与模型组相比,各用药组可明显改善乙醇引起的肝损伤,清肝活血方各剂量组及易善复组均能显著降低大鼠血清ALT,AST水平($P<0.05$),在改善AST方面清肝活血方优于易善复;清肝活血方高剂量及易

善复能降低血清 γ -GT($P<0.05$,表1).

2.1 乙醇引起的肝损伤大鼠病理变化 空白组大鼠HE染色显示,大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,呈放射状,肝窦正常,胞核结构清晰;Masson染色显示仅有少量胶原表达于中央静脉壁.模型组大鼠肝索排列紊乱,炎细胞浸润和组织坏死明显,可见桥接坏死,成纤维细胞大量增生,肝小叶结构不完整;Masson染色显示肝细胞周围纤维沉积增加,中央静脉周围、汇管区胶原纤维增粗并向小叶内延伸.各治疗组炎细胞浸润及组织坏死减轻,成纤维细胞增生减少,部分肝小叶结构有所恢复;Masson染色显示肝脏胶原沉积均有不同程度减少,纤维间隔缩短变窄,纤维化分期下降;且炎症纤维化程度随用药剂量的加大而减轻呈一定量效关系,但中药与西药对照组间无明显差异(图1,表2).

2.2 TUNEL及TUNEL- α -SMA双标记检测 TUNEL肝细胞凋亡染色显示,空白组偶见肝细胞

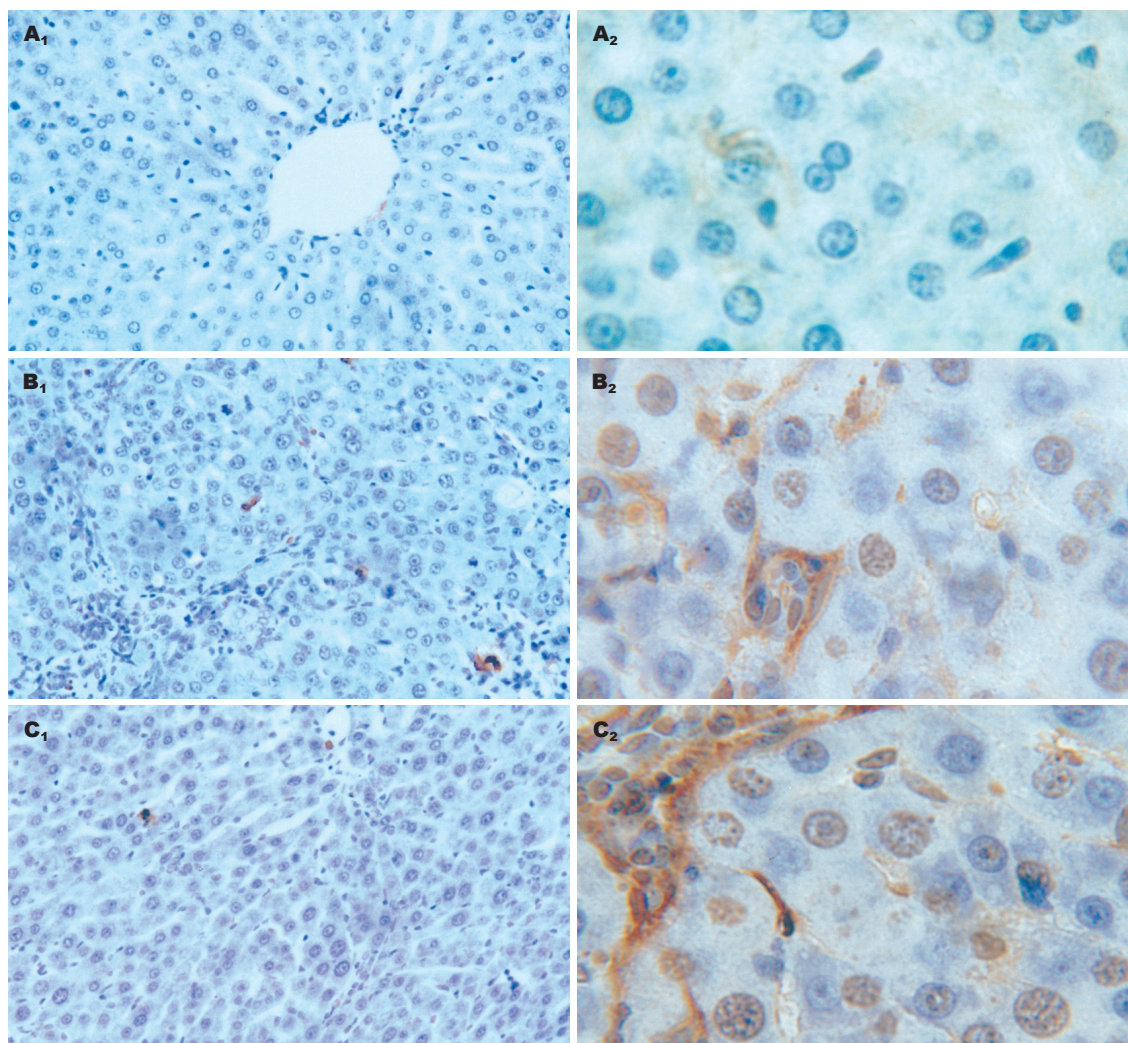


图 2 肝细胞和HSC凋亡的检测结果. A: 空白组; B: 模型组; C: 治疗组(A₁-C₁: 肝细胞TUNEL×400; A₂-C₂: HSC TUNEL-α-SMA×800).

表 1 清肝活血方治疗乙醇引起的肝损伤及大鼠肝功能的变化 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	γ-GT (nkat/L)
空白组	12	375 ± 233 ^{ac}	526 ± 119 ^{ac}	1413 ± 316 ^{ac}
模型组	8	2140 ± 428 ^c	4454 ± 850 ^c	8271 ± 3304 ^c
易善复组	9	1432 ± 253 ^a	2123 ± 413 ^a	5509 ± 2430 ^a
清肝活血方高剂量	12	1213 ± 245 ^a	1671 ± 400 ^{ac}	4539 ± 1847 ^a
清肝活血方中剂量	11	1414 ± 211 ^a	1692 ± 283 ^{ac}	6093 ± 2684
清肝活血方低剂量	10	1481 ± 180 ^a	1633 ± 264 ^{ac}	6043 ± 1305

^a*P*<0.05 vs 模型组, ^c*P*<0.05 vs 易善复组.

凋亡, 模型组凋亡的肝细胞散在于小叶内, 经药物治疗后各给药组可明显较少肝细胞凋亡 (*P*<0.05), 各用药组间比较发现中药高剂量优于其他药物组, 且呈一定量效关系; TUNEL-α-SMA双标记HSC凋亡显示空白组未见凋亡的HSC, 模型组存在肝窦、胶原沉积处可见大量活化HSC, 药物处理后HSC凋亡指数明显增加

(*P*<0.05), 中药组间存在一定量效关系. 高剂量组优于其他药物组(图2, 表2).

3 讨论

现代医学认为, 饮酒超过5 a, 折合乙醇量男性≥40 g/d, 女性≥20 g/d将导致酒精性肝病^[5]. 乙醇对肝脏的影响表现为, 乙醇对组织和细胞的

表 2 乙醇引起的肝损伤大鼠肝细胞凋亡指数比较(mean \pm SD, $n = 5$)

分组	炎症	纤维化	肝细胞凋亡指数 (%)	HSC凋亡指数 (%)
空白	0	0	0.05 \pm 0.12 ^{ac}	0 ^{ac}
模型	9.75 \pm 2.12	9.00 \pm 2.27	1.77 \pm 0.49 ^c	2.30 \pm 1.24 ^c
易善复组	6.30 \pm 3.16 ^a	6.30 \pm 3.16 ^a	0.60 \pm 0.16 ^a	3.63 \pm 2.04 ^a
清肝活血方高剂量	4.7 \pm 2.70 ^a	5.5 \pm 2.50 ^a	0.43 \pm 0.11 ^{ac}	5.25 \pm 2.48 ^{ac}
清肝活血方中剂量	6.55 \pm 2.94 ^a	6.00 \pm 3.00 ^a	0.64 \pm 0.13 ^a	3.81 \pm 1.98 ^a
清肝活血方低剂量	6.60 \pm 2.76 ^a	7.20 \pm 2.53	0.65 \pm 0.15 ^a	3.55 \pm 1.93 ^a

^a $P < 0.05$ vs 模型组, ^c $P < 0.05$ vs 易善复组.

直接损伤作用;乙醇在肝脏代谢过程,可使2分子的氧化型辅酶 I (NAD)转变为还原型辅酶 I (NADH), NADH/NAD的比值明显增高,使细胞的氧化还原状态改变,对葡萄糖合成、脂质代谢及蛋白质的分泌有广泛的影响.乙醇对肝脏的毒性作用更大,主要表现在:(1)降低肝脏对脂肪酸的氧化;(2)损伤线粒体、抑制三羧酸循环;(3)影响肝脏的微管系统,使微粒蛋白分泌减少,造成脂质和蛋白质在肝脏细胞中沉积;(4)与细胞膜结合,改变其通透性及流动性,从而导致肝细胞的损伤;(5)抑制DNA的修复和DNA中胞嘧啶的甲基化,从而抑制细胞的分化及损伤组织的再生、修复;(6)乙醇能增加胶原的合成及mRNA的合成,促进肝纤维化的形成.另外,乙醇蛋白加合物可作为半抗原引起免疫反应,并可刺激肝脏胶原合成直接导致ALF.祖国医学对于过度饮酒而引起的损害已有了较全面的认识,传统中医虽然没有酒精性肝病的病名,但将其归属于伤酒、酒风、酒疸、酒积、酒癖、酒癥的范畴之内,其中酒精性肝纤维化当属于酒癖的范畴^[6-7].本方是在临床流行病学调查发现“湿热”与“瘀血”为酒精性肝病主要病理因素的基础上,拟定了以清肝利湿、活血散瘀为主要功效的“清肝活血方”.方用柴胡、黄芩为君,疏肝解郁,和解少阳;黄芩清热燥湿,泻火解毒.丹参、鳖甲为臣,丹参凉血清热、养血和血、祛瘀生新;鳖甲软坚散结.配以葛根为佐,生津止渴、升发清阳.全方清肝、活血并用,切中酒精性肝病机特点.实验血清酶学及病理学结果显示,清肝活血方能显著降低酒精性肝纤维化大鼠血清ALT, AST, γ -GT水平,减轻炎症纤维化程度($P < 0.05$),并且清肝活血方低剂量、中剂量、高剂量间有一定量效关系,而在血清AST上清肝活血方优于西药对照组.

目前认为,肝纤维化发生的核心是HSC的活

化增殖,乙醇引起的肝纤维化也不例外,活化的HSC转分化为MFb样细胞表型,能合成除V型胶原外的几乎所有细胞外基质(ECM)成分,同时活化的HSC表达TIMP-1, TIMP-2以及TGF- β 等阻碍ECM的降解,加重肝纤维化的程度^[8].有实验显示,在HSC激活的过程中可以观察到HSC的凋亡现象,且随着激活过程的进展,凋亡数目所占的比例也逐渐增加而静止期没有凋亡现象^[9-10].因此消除炎症刺激、减少促纤维化因子释放、促进ECM的降解、减少HSC的活化及促使过量的HSC凋亡成为治疗的靶点,通过细胞凋亡使HSC减少对肝纤维化进行治疗也是一种新的探索.TUNEL及TUNEL- α -SMA双标记检测结果显示,与模型组相比清肝活血方各剂量组能够显著减少乙醇引起的肝细胞凋亡,并能增加过度增殖活化HSC凋亡($P < 0.05$),并且清肝活血方高剂量组优于西药对照组,提示清肝活血方抗纤维化作用可能是通过诱导星状细胞凋亡实现的,抑制肝细胞凋亡在改善肝功能方面有一定作用.近年来,随着对中医药研究的深入,中医药防治酒精性肝病的良好疗效逐渐被人们所认识,但由于中药成分复杂,作用环节多,因此对其作用机制的研究还需进一步深入.

4 参考文献

- 1 Wang L, Ji G, Zheng PY, Long AH. Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis induced by complex factors. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2006; 4: 281-284
- 2 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 312-313
- 3 房龙, 马安林, 李靖涛, 王远新, 王泰龄, 赵洪川. 茵三硫对大鼠酒精及四氯化碳致肝纤维化的防治作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 429-432
- 4 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
- 5 厉有名. 酒精性肝病的诊断. *临床内科杂志* 2004; 21:

- 75-76
- 6 季光, 曹承楼. 酒精性肝病的中医研究. 辽宁中医杂志 2001; 28: 198-199
- 7 丁霞, 田德禄, 姚雪彪. 中医学对酒精性肝纤维化的认识. 中华中医药杂志 2006; 21: 50-53
- 8 Breikopf K, Lahme B, Tag CG, Gressner AM. Expression and matrix deposition of latent transforming growth factor beta binding proteins in normal and fibrotic rat liver and transdifferentiating hepatic stellate cells in culture. *Hepatology* 2001; 33: 387-396
- 9 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997; 151: 1265-1272
- 10 Ji G, Wang L, Zhang SH, Liu JW, Zheng PY, Liu T. Effect of Chinese medicine Qinggan Huoxuefang on inducing HSC apoptosis in alcoholic liver fibrosis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2047-2052

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号. 《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文. 《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.