

灵芝孢子粉对人肝癌细胞HepG2及裸鼠移植瘤生长的抑制作用

王顺官, 王筱婧, 李琳, 徐江平

背景资料
灵芝是担子菌纲多孔科灵芝属真菌, 公认为扶正固本、滋补强壮的传统中药。临床报道孢子粉可改善机体的免疫功能, 防治癌症, 减轻患者对放、化疗的不良反应。

王顺官, 广东省第二人民医院肿瘤放射治疗科 广东省广州市 510317
王筱婧, 李琳, 徐江平, 南方医科大学药学院药理学系 广东省广州市 510515
广东省中医药管理局建设中医药强省课题资助项目, No. 2006-31-1060014
作者贡献分布: 此课题由王顺官, 徐江平设计; 研究过程由王顺官, 王筱婧, 李琳, 徐江平操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王筱婧提供; 数据分析由王顺官, 王筱婧, 李琳, 徐江平完成; 本论文写作由王顺官, 王筱婧, 李琳, 徐江平完成。
通讯作者: 王顺官, 510317, 广东省广州市, 广东省第二人民医院肿瘤放射治疗科。 xujiangping@vip.tom.com
收稿日期: 2008-01-03 修回日期: 2008-02-27

Inhibitory effect of Lucid Ganoderma spore on human hepatocarcinoma cell line HepG2 and growth of transplanted tumor in nude mice

Shun-Guan Wang, Xiao-Jing Wang, Lin Li, Jiang-Ping Xu

Shun-Guan Wang, Department of Radiation Oncology, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China
Xiao-Jing Wang, Lin Li, Jiang-Ping Xu, Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation for the Construction of Strong Province in Traditional Chinese Medicine from Administration Department of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province, No. 2006-31-1060014

Correspondence to: Shun-Guan Wang, Department of Radiation Oncology, the Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China. xujiangping@vip.tom.com

Received: 2008-01-03 Revised: 2008-02-27

Abstract

AIM: To evaluate the inhibitory effects of Lucid Ganoderma spore (LGS) on human hepatocarcinoma cell line HepG2.

METHODS: MTT assay was used to detect the *in vitro* inhibition of LGS on human hepatocarcinoma cell line HepG2. Nude mouse model of human hepatocarcinoma was established and growth of the transplanted tumor was ob-

served *in vivo*. The morphology of tumor cells was observed by microscopy after HE staining.

RESULTS: MTT assay showed that the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was decreased with the increasing of time. The minimum value of IC_{50} was observed at 72 h (2.14 g/L). *In vivo* study revealed that LGS had an inhibitory action on HepG2 cells (dose: 2000 mg/kg, inhibitory rate: 57.0%). The morphologic observation exhibited larger areas of necrosis and less degree of atypia after LGS treatment.

CONCLUSION: LGS has inhibitory action on human hepatocarcinoma cell line HepG2 at high concentrations and high dosages.

Key Words: Lucid Ganoderma spore; Hepatocarcinoma; HepG2 cell; Methyl thiazolyl tetrazolium assay

Wang SG, Wang XJ, Li L, Xu JP. Inhibitory effect of Lucid Ganoderma spore on human hepatocarcinoma cell line HepG2 and growth of transplanted tumor in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(10): 1114-1118

摘要

目的: 研究灵芝孢子粉对人肝癌细胞HepG2生长的抑制作用。

方法: 运用MTT法研究灵芝孢子粉水溶性成份在体外对HepG2细胞的抑制作用, 并利用裸小鼠的移植瘤模型研究灵芝孢子粉在体内对HepG2细胞的生长抑制作用。HE染色观察肝癌组织结构和细胞形态改变。

结果: TMTT实验结果表明灵芝孢子粉对HepG2细胞的 IC_{50} 值随作用时间增加而减小, 72 h达到最低, 为2.14 g/L。体内抑瘤实验结果显示灵芝孢子粉为2000 mg/kg时, 对裸小鼠移植瘤的抑制率为57.0%。镜下观察灵芝孢子粉治疗组肿瘤坏死组织较多, 细胞异型性较小。

结论: 高浓度及高剂量的灵芝孢子粉具有抑

同行评议者
张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科

制肿瘤细胞生长的作用.

关键词: 灵芝孢子粉; HepG2; 肝癌; 四唑盐比色法

王顺官, 王筱婧, 李琳, 徐江平. 灵芝孢子粉对人肝癌细胞HepG2及裸鼠移植瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(10): 1114-1118

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1114.asp

0 引言

灵芝是担子菌纲多孔科灵芝属真菌, 其生长成熟后所散发出来的孢子体即灵芝孢子粉. 灵芝孢子粉富含多糖肽, 有机锗, 多种氨基酸, 脂肪酸及微量元素等成份. 临床报道孢子粉可改善机体的免疫功能, 防治癌症, 减轻患者对放、化疗的不良反应. 以往药理研究表明, 灵芝孢子粉可增强免疫功能, 并对多种移植性动物肿瘤有明显的抑制作用^[1-3]. 但灵芝孢子粉对体外培养人癌细胞的直接作用及人癌裸鼠移植瘤治疗作用的研究则较少. 本文报道灵芝孢子粉体外对人肝癌细胞株HepG2生长的抑制作用及对裸小鼠人HepG2移植瘤的抗肿瘤作用的研究.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2为人肝癌细胞株, 武汉大学中国典型培养物保藏中心, 用DMEM培养基(含100 mL/L小牛血清, 青霉素100 kU/L, 链霉素100 mg/L), 37℃, 50 mL/L CO₂培养. 实验动物为6-9 wk龄BALB/c裸小鼠, 22-30 g, 23只, 雌雄兼有, 无特定病原体(SPF)条件下饲养, 由南方医科大学动物实验中心提供. 灵芝孢子粉(B), 广州盈康科技有限公司提供. 5-氟脲嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU), 江苏南通精华制药有限公司产品. 噻唑蓝(MTT), Sigma产品, 北京鼎国公司分装, 用PBS配制成5 g/L溶液, 无菌滤膜过滤, 4℃避光保存.

1.2 方法

1.2.1 体外细胞毒实验(MTT法): 按照Mosmann *et al*^[4]描述的方法进行实验. 取对数生长期的HepG2细胞, 2.5 g/L胰酶消化成单个细胞, 配制细胞悬液, 计数板计数为 5×10^7 cell/L, 于96孔培养板内每孔接种100 μ L(每孔含 5×10^3 个细胞, 经反复实验得出较为合适的细胞数目), 放入培养箱中孵育, 24 h贴壁弃上清液, 加入180 μ L DMEM培养基继续孵育24 h使细胞生长同步化. 用加入终浓度为10 g/L DMSO的DMEM配制灵芝孢子粉B, 设5个浓度, 5 g/L、2.5 g/L、1.25 g/L、0.625 g/L、0.3125 g/L, 并用0.22 μ m微孔

滤膜过滤除菌. 阳性对照5-FU DMEM稀释, 使终浓度为180 mg/L(通过从250 mg/L、180 mg/L、150 mg/L、120 mg/L、90 mg/L、60 mg/L等6个浓度中筛选出较合适浓度). 并设调零孔, 空白对照及等体积DMSO溶剂对照, 每组设5-6个平行孔. 待HepG2细胞同步化完成后, 加入药物20 μ L/孔, 空白孔加入等量DMEM. 放入孵箱中分别孵育24 h、48 h、72 h、96 h后, 每孔加入MTT 20 μ L, 放入孵箱继续孵育4-6 h. 终止培养, 小心吸弃孔内培养液上清, 每孔加入DMSO 150 μ L, 振荡15 min, 使甲臞结晶充分溶解. 于酶标仪570 nm处测各孔A值, 并计算药物对细胞生长的抑制率, 抑制率 = (1-给药组平均A值/对照组平均A值) \times 100%. 以上每组实验重复3次, 并用Logit法计算半数抑制浓度IC₅₀值.

1.2.2 体内抑瘤实验(人肝癌细胞HepG2裸鼠移植瘤的生长抑制实验): 取对数生长期的人肝癌HepG2细胞, 2.5 g/L胰酶消化后, 用无血清DMEM配成 1×10^{10} cell/L的单细胞悬液. 在无菌条件下接种于裸鼠腋窝皮下, 0.2 mL/只(相当于每只裸鼠接种 2×10^6 个肿瘤细胞)^[5]. 接种1 wk后可见肿瘤生长, 当肿瘤大小到直径约为3-4 mm时(接种10 d以后), 将荷瘤裸鼠按肿瘤大小随机分为3组, 每组7-8只裸鼠, 雌雄兼有, (1)空白组: 生理盐水100 mL/kg, ig, 每日给药; (2)阳性对照组: 5-FU, 用生理盐水稀释, 无菌分装, 20 mg/kg, ip, 隔日给药; (3)给药组: 灵芝孢子粉B, 5 g/L CMC-Na配制, 高压灭菌, 2000 mg/kg, ig, 每日给药. 共给药21 d. 自接种后每日测量裸鼠体质量, 每周用游标卡尺测量裸鼠肿瘤的长(a)短(b)径, 并按以下公式计算相对体积. $V = 0.5ab^2$, 各组按时间点的平均瘤体积作生长曲线图. 末次给药后24 h时处死动物, 剥离肿瘤称质量. 做大体和病理观察, 部分肿瘤组织用40 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续4 μ m切片, HE染色, 光镜下观察肝癌细胞坏死, 形态改变情况. 计算各组抑瘤率, 抑瘤率 = (1-用药组平均瘤质量/空白组平均瘤质量) \times 100%, 实验重复两次.

统计学处理 用SPSS10.0统计软件进行分析, 结果以mean \pm SD表示, 用One-Way ANOVA和t-test进行分析. 给药组组间比较用LSD法.

2 结果

2.1 灵芝孢子粉水溶性成份对HepG2细胞的作用 灵芝孢子粉水溶性成份对HepG2细胞具有明显的抑制作用, 随着时间延长和剂量的增加, 对

研发前沿
药理研究表明, 灵芝孢子粉可增强免疫功能, 并对多种移植性动物肿瘤有明显的抑制作用.

相关报道

近年来研究表明灵芝具有多方面的生理活性及药理作用. 目前认为, 灵芝孢子粉的抗肿瘤作用与增强免疫功能有关.

表 1 灵芝孢子粉体外对HepG2细胞生长增殖的影响 (mean \pm SD)

药物	剂量 (mg/kg)	48 h			72 h			96 h		
		A_{570}	IR(%)	IC ₅₀ (CI 95%)	A_{570}	IR(%)	IC ₅₀ (CI 95%)	A_{570}	IR(%)	IC ₅₀ (CI 95%)
对照组	—	1.109 \pm 0.003			1.503 \pm 0.046			1.774 \pm 0.035		
5-FU	180	0.582 \pm 0.013	47.5 ^b		0.389 \pm 0.014	74.1 ^b		0.341 \pm 0.005	80.1 ^b	
灵芝孢 子粉B药	5	0.691 \pm 0.009	37.7 ^b	14.2	0.678 \pm 0.016	54.9 ^b	2.14	0.829 \pm 0.023	53.3 ^b	2.88
	2.5	0.774 \pm 0.018	30.2 ^b	(6.42-89.65)	0.740 \pm 0.016	50.8 ^b	(1.73-2.32)	0.916 \pm 0.006	48.4 ^b	(2.05-4.83)
	1.25	0.838 \pm 0.017	24.4 ^b		0.790 \pm 0.009	47.1 ^b		0.966 \pm 0.032	45.5 ^b	
DMSO		0.992 \pm 0.080			1.465 \pm 0.038			1.694 \pm 0.047		

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

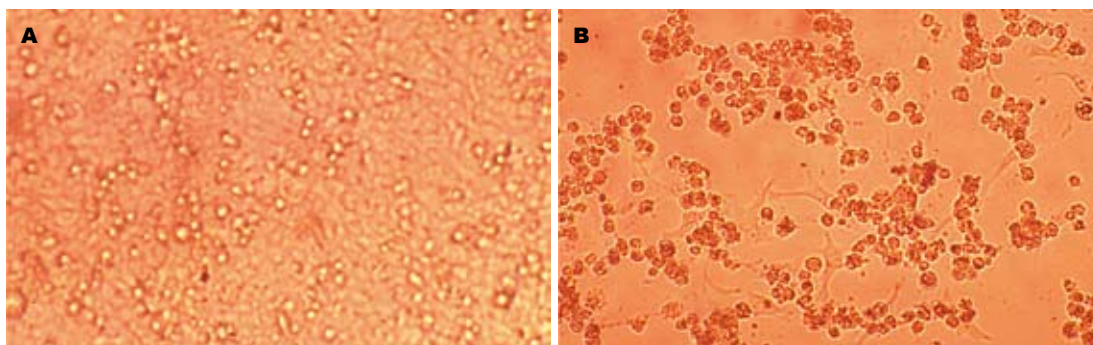


图 1 灵芝孢子粉水溶性成份对HepG2细胞的作用. A: 空白组HepG2细胞; B: 1.25 g/L灵芝孢子粉B作用72 h后HepG2细胞.

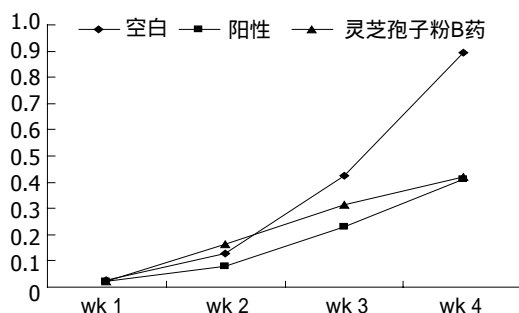


图 2 裸鼠肿瘤体积生长曲线.

肿瘤细胞的抑制作用越强, 具有一定的时间和剂量效应关系. B药对HepG2细胞的IC₅₀值, 随着作用时间增加而减小, 在72 h时达到最低, B药的IC₅₀值为2.14 g/L, 表明HepG2细胞在72 h时对B药最为敏感(表1). 空白组和B组作用72 h后镜下观察结果, 可看出灵芝孢子粉对HepG2细胞具有明显的抑制作用(图1A-B).

2.2 体内抑瘤实验 高剂量的灵芝孢子粉B对裸小鼠移植瘤的生长具有一定抑制作用, 并且对裸鼠体质量增加无影响(表2). 观察其活动进食状况均无明显异常, 表明灵芝孢子粉B对裸鼠的生长并无明显的毒副作用. 当ig给药剂量为2000 mg/kg时, 其对裸鼠移植瘤生长的抑制率达到了57.0%(图2, 表3).

表 2 灵芝孢子粉B对人肝癌HepG2裸小鼠移植瘤的治疗作用

分组	剂量 (mg/kg)	给药方式 (\times d)	n		肿瘤质量(g) (mean \pm SD)	抑制率 (%)
			开始	结束		
对照组	—	—	10	10	1.3102 \pm 0.42	—
5-FU	20	ip \times 10	10	10	0.4575 \pm 0.13 ^b	65.1%
灵芝孢 子粉B药	2100	iv \times 21	10	10	0.5635 \pm 0.20 ^b	57.0%
	1050	iv \times 21	10	10	0.8242 \pm 0.19 ^b	37.1%
	500	iv \times 21	10	10	1.0899 \pm 0.40 ^a	16.8%

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.3 病理观察-大体观 对照组肿瘤组织大, 血供丰富, 质脆, 易出血, 界限不清, 不易分离, 切面呈鱼肉样, 灵芝孢子粉治疗组肿瘤组织小, 血供不丰富, 界限较为清楚. HE染色镜下观察: 对照组表现为肿瘤组织内见小片坏死, 肿瘤细胞生长旺盛, 呈条状、索状, 细胞核异型性明显, 细胞分化较低, 间质血管丰富(图3A). 灵芝孢子粉治疗组表现为肿瘤组织内坏死区增大, 肝癌细胞部分呈梭型, 间质血管较稀少, 有明显的纤维化形成, 可见肿瘤细胞生长受到抑制(图3B).

3 讨论

灵芝被公认为扶正固本, 滋补强壮的传统中药.

表 3 灵芝孢子粉B对人肝癌HepG2裸小鼠移植瘤生长的影响

分组	n	肿瘤体积(cm ³)			
		wk 1	wk 2	wk 3	wk 4
对照组	7	0.025 ± 0.012	0.127 ± 0.077	0.426 ± 0.357	0.896 ± 0.345
5-FU	8	0.023 ± 0.012	0.081 ± 0.030	0.231 ± 0.122	0.413 ± 0.228 ^a
灵芝孢子粉B药	8	0.024 ± 0.010	0.163 ± 0.121	0.312 ± 0.161	0.420 ± 0.179 ^a

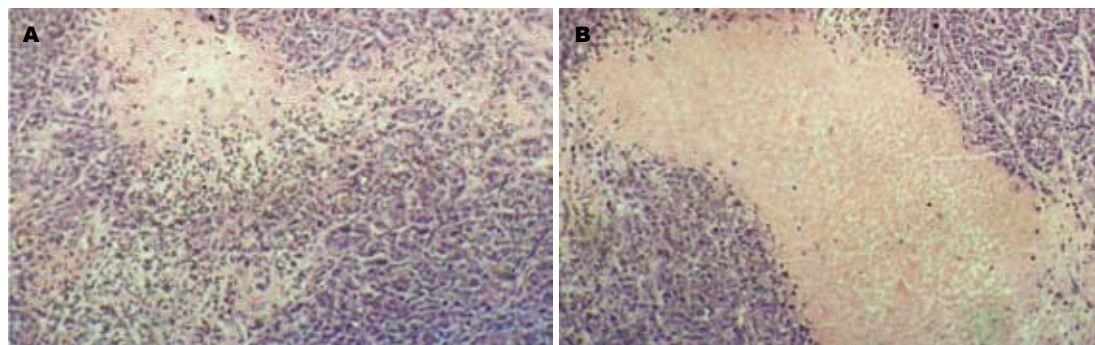
^aP<0.05 vs 对照组.

图 3 病理观察-大体观(H&E染色×40). A: 对照组; B: 灵芝孢子粉治疗组.

灵芝孢子粉是灵芝的精华, 其有效成份^[6-8]如多糖类、腺苷类、氨基酸类、维生素类远远超过了灵芝. 近年来研究表明灵芝具有多方面的生理活性及药理作用^[9-13]. 目前认为, 灵芝孢子粉的抗肿瘤作用与增强免疫功能有关^[14-17].

在本实验条件下, 体外实验表明高剂量的灵芝孢子粉对HepG2细胞具有直接的抑制作用, 并成剂量和时间依赖性. 生药剂量为5 g/L的灵芝孢子粉水溶液, 作用96 h, 抑制率最高可达55.6%. 虽然其对HepG2的IC₅₀值与一些抗癌药物相比较低, 但由于水中溶解成份有限, 因此仍可认为对肿瘤细胞的生长具有直接的抑制作用. 体内实验结果也表明, 灵芝孢子粉对于裸鼠人HepG2移植瘤具有一定的抑制作用. 给药剂量2000 mg/kg, 抑瘤率可达57.0%, 且无明显毒副作用. 另一方面, 本实验采用BALB/C-nu品系的裸鼠, 无胸腺且功能性T淋巴细胞缺损, 免疫功能低下. 在此情况下, 灵芝孢子粉仍对移植瘤具有一定的抑制作用, 说明其作用机制不单单在于提高机体免疫力, 更有可能与直接抑制肿瘤生长有关. 因此无论在体内或体外, 灵芝孢子粉对肿瘤细胞均有一定的直接抑制作用.

目前灵芝孢子粉在体内外抑制肿瘤细胞生长的作用机制尚不清楚, 一些研究表明其抗肿瘤作用可能与抑制TOP I、TOP II异构酶^[18], 破坏肿瘤细胞端粒酶^[19]有关. 本实验中肿瘤组织的

病理切片HE染色后观察, 发现给药组与对照组相比, 不但坏死区域增加, 纤维化明显, 而且间质血管明显少于对照组, 提示其作用机制或许也与抑制肿瘤血管生成有关. 其具体的作用机制还需进一步实验研究.

4 参考文献

- 1 李怡岚, 乔姗姗, 李国兴. 灵芝粉抗肿瘤及提高机体免疫力作用的研究. 中国慢性病预防与控制 2004; 12: 156-157, 160
- 2 余素清, 吴树勋, 刘京生, 韩彩芝, 魏丽君. 灵芝孢子粉对小鼠免疫功能的影响及抗⁶⁰Co辐射效应. 中国中药杂志 1997; 22: 625-626
- 3 韩玉复, 苏桂芬, 苏鑫, 韩绍巍. 灵芝的研究进展. 中药材 1995; 18: 266-268
- 4 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63
- 5 魏泓. 医学实验动物学. 第2版. 成都: 四川科学技术出版社, 2001: 595-596
- 6 罗志明. 灵芝孢子的微量元素含量和药理应用分析. 广东微量元素科学 2003; 10: 42-48
- 7 张能荣, 张秀云. 灵芝孢子粉中维生素和多糖的分析. 中国生化药物杂志 1997; 18: 37-38
- 8 张丽霞, 赵桂梅, 吴明江, 曹鹏宇, 张丽萍. 灵芝未破壁孢子粉水溶性多糖的分离与鉴定. 中国药学杂志 2006; 41: 230-232
- 9 李晔, 肖志勇, 毛景华, 黄宗锈. 灵芝孢子油对化学性肝损伤保护作用的研究. 广西中医药 2006; 29: 50-51
- 10 杨星昊, 方放治. 灵芝孢子粉对小鼠实验性突变和移植性肿瘤的影响. 第一军医大学学报 2000; 20: 245-246
- 11 郭家松, 沈志勇, 詹朝双, 李艳, 李振林. 灵芝孢子粉及灵芝孢子蜂胶对急性胃溃疡形成的影响. 第一军医大

名词解释

灵芝孢子粉: 灵芝生长成熟后所散发出来的孢子体, 富含多糖肽, 有机锗, 多种氨基酸, 脂肪酸及微量元素等成份.

同行评价

本文就灵芝孢子粉对人干癌细胞HepG2及其裸鼠移植瘤生长的作用进行研究,发现灵芝孢子粉具有抑制肿瘤生长的作用,具有较大的科学价值。

- 12 赵红宇, 李文斌, 李洪源, 周宪君, 赵岩. 破壁灵芝孢子粉对肝纤维化的影响研究. 黑龙江医药科学 2006; 29: 96
- 13 陈雪华, 朱正纲, 马安伦, 余奇文. 灵芝孢子粉对荷HAC肝癌小鼠抗肿瘤的试验性研究. 上海免疫学杂志 2000; 20: 101-103
- 14 王鹏云, 王赛贞, 林树钱, 林志彬. 灵芝孢子和破壁孢子多糖对体外培养的小鼠脾淋巴细胞及腹腔巨噬细胞免疫调节活性的比较. 北京大学学报(医学版) 2005; 37: 569-574
- 15 陈小君, 冯翠萍, 梅承恩, 刘昕, 钟南强. 萌动激活赤灵芝孢子粉对小鼠脾细胞IL-2的分泌和脾淋巴细胞转化增殖的影响. 氨基酸和生物资源 2001; 23: 45-47
- 16 王欢, 王淑秋. 灵芝孢子粉对癫痫大鼠皮质和海马区NMDAR1免疫反应影响的研究. 黑龙江医药科学 2006; 29: 11-13
- 17 李铁民, 朱继红, 刘冲, 赛吉热呼, 新春, 李昱. 灵芝干膏和灵芝孢子粉对小鼠腹腔巨噬细胞酸性磷酸酶活性的影响. 食用菌学报 2004; 11: 30-33
- 18 蒋超, 卿晨, 蒙凌华, 丁健. 灵芝提取物对DNA拓扑异构酶的抑制作用及诱导K562细胞凋亡. 癌症 1999; 18: 661-663, 667
- 19 陈小君, 冯翠萍, 梅承恩, 刘昕, 钟南强. 萌动激活灵芝孢子粉对肿瘤组织端粒酶抑制作用的研究. 中草药 2001; 32: 165-166

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第3套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-04-08)